

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Definición de biomarcadores discriminatorios de fenotipos
clínicos en enfermedades respiratorias complejas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Selene Baos Muñiz

Directora

Blanca Cárdenas Olombrada

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Definición de biomarcadores discriminatorios
de fenotipos clínicos en enfermedades
respiratorias complejas: asma y alergia**

Memoria para optar al Título de Doctor presentada por
SELENE BAOS MUÑIZ

Bajo la dirección de
DRA. BLANCA CÁRDABA OLOMBRADA

Madrid, 2018

El trabajo presentado en esta memoria se ha realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Blanca Cárdena y financiado por una beca de investigación Conchita Rábago y el Proyecto de Investigación FIS PI 13/1730.

BLANCA CÁRDABA OLOMBRADA, DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID E INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (IIS-FJD).

CERTIFICA: Que Doña **Selene Baos Muñiz** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el trabajo necesario para la realización de su Tesis Doctoral:

"Definición de biomarcadores discriminatorios de fenotipos clínicos en enfermedades respiratorias complejas: asma y alergia".

Revisado el trabajo, quedo conforme para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, en la Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Madrid a 18 de Junio del dos mil dieciocho.



Blanca Cárdena Olombrada

“Hay un fuego dentro que nos guía desde niños,
la llama se quema si detrás no hay un latido”

La M.O.D.A.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Tantos son los recuerdos y emociones que tengo en este momento que no sé cómo empezar a escribir estas palabras. No será el apartado de agradecimientos más original que se haya escrito ni el más gracioso, pero sin duda es uno de los más sinceros. En mi viaje llamado “Tesis” ha habido cielos azules, turbulencias e incluso caídas en picado pero lo que siempre ha estabilizado el rumbo han sido todas las personas que me han acompañado.

Gracias a la Dra. Blanca Cárdbaba, por darme la oportunidad de empezar este viaje y conseguir que lo terminase. Gracias por tu paciencia, tu confianza y tus consejos. Por tu cercanía. Tus correcciones de mi “spanglish”. Gracias por ser una luchadora. Sin ti, Blanca, esta Tesis no habría existido.

Gracias a la Fundación Conchita Rábago por concederme tres años de beca de investigación para realizar mi Tesis y a la Fundación Jiménez Díaz por ser mi casa durante estos cinco años.

Al Servicio de Alergología y Neumología de la Fundación Jiménez Díaz.

A mis compañeros de laboratorio, David y Lucía. Dr. Calzada, amigo, tu encendiste el motor de este avión, con ese “oye pues podrías solicitar esta beca...” Así empezó todo. Gracias por siempre estar para escuchar y para echar una mano. Luci, la alegría del laboratorio, gracias por tu sonrisa. Gracias por ver siempre el lado positivo de las cosas. Por las risas y las charlas. No me cabe la menor duda que llegarás lejos.

También me gustaría mencionar a la cuarta planta en general con los grandes departamentos de “reuma” y “nefro” y su gran gente. A los laboratorios de al lado: al “labo 4 de inmuno” con Carlos, Vanesa y Gloria, gracias por vuestras sonrisas y ánimos; y por el otro lado al “labo 1”, en concreto, a Bea, Toño, Jose e Inés por simplemente estar ahí para un café, para un respiro o para un consejo. Además, agradecer a Ignacio Mahillo su paciencia y su cerebro matemático y a Curra su arte con el microscopio confocal.

Especial mención, a Julia y a Pilar, por tratarme con tanto cariño, alegrándose en los buenos momentos y preocupándose en los de bajón.

Agradecer también a mis amigas que, aunque no entendiesen del todo el tema de mi Tesis, siempre han creído en mí. Las de Madrid: Lupina, Isthara, Mar y Martita. Las de Múnich: Laura, Sofía y María. Las de Zaragoza: Anita, Laura, Nuria y Sonia. Las de la universidad: Celia y Marta. Sois las hermanas que se eligen.

A Lucas, mi amigo fiel, por sus paseos, su alegría y su amor incondicional.

Gracias a mi familia, y en especial a mi hermano y a mis padres. Román, gracias por siempre estar ahí. Aunque no te lo diga a menudo, te admiro mucho. ¡Gracias por traer a mi vida a la mejor “cuñi” que existe, Maribell!

Mamá, papá, vosotros habéis conseguido lo que soy ahora. Gracias por confiar en mí y apoyarme en todas mis decisiones. Por alegraros con mis éxitos. Sois mis consejeros y mis modelos a seguir. Os quiero.

A Rodri, mi copiloto en la vida. Gracias por animarme, por aguantarme, por encontrar siempre una solución, por abrazarme en la distancia, por hacer que lo imposible fuese posible, en definitiva, gracias por quererme. Yo sí que “soy fan de ti”.

ÍNDICE

ÍNDICE	15
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	21
RESUMEN	27
SUMMARY	33
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	39
INTRODUCCIÓN	45
1. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ANTÍGENOS EXÓGENOS	47
1.1.Respuesta tolerogénica.....	47
1.2.Enfermedad alérgica.....	48
1.2.1. Factores desencadenantes: alérgenos	48
1.2.2. Patogenia	49
1.2.3. Síntomas, diagnóstico y tratamiento.....	53
2. ENFERMEDAD ASMÁTICA.....	54
2.1.Factores de riesgo.....	54
2.2.Patogenia.....	57
2.3.Síntomas y diagnóstico	60
2.4.Clasificación.....	62
2.4.1. Gravedad clínica.....	64
2.5.Tratamiento	65
3. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.....	66
3.1.Definición.....	66
3.2.Factores de riesgo.....	67
3.3.Patogenia.....	67
3.4.Síntomas y diagnóstico	69
4. NUEVAS TECNOLOGÍAS DE ANÁLISIS MASIVO PARA EL CONOCIMIENTO DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS	70
5. MEDICINA DE PRECISIÓN Y BIOMARCADORES DE ASMA Y ALERGIA	73
OBJETIVOS	79
MATERIALES Y MÉTODOS	83
1. POBLACIONES DE ESTUDIO.....	85
1.1. Criterios de selección	85
1.2. Clasificación de los sujetos.....	86
2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	87
2.1. Recogida de muestras.....	88
2.2. Obtención de suero.....	88

2.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	88
3. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE IgE TOTAL.....	90
4. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.....	90
5. EXTRACCIÓN DEL ARN	91
5.1. Cuantificación del ARN	91
6. EXTRACCIÓN DEL ADN	92
6.1. Cuantificación del ADN.....	92
7. EXTRACCIÓN PROTEICA.....	92
7.1. Cuantificación de proteínas.....	93
8. VALIDACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES DE ASMA Y ALERGIA	94
8.1. Selección de genes de estudio	94
8.2. Análisis de muestras por qRT-PCR en tarjetas microfluídicas	95
8.3. Procesamiento de los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR	96
8.3.1. Normalización, filtrado de los resultados y análisis estadístico.....	96
8.3.2. Análisis de componentes principales	97
8.3.3. Análisis estadístico de la expresión génica.....	97
8.3.4. Análisis funcional de los datos de expresión génica	97
9. ESTUDIO EPIGENÉTICO	99
9.1. Análisis estadístico.....	101
10. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA.....	101
10.1. Análisis por <i>western blot</i>	102
10.2. Análisis por ELISA	104
10.3. Análisis estadístico.....	105
11. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD POR CURVAS ROC...105	
12. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	106
13. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE MSR1 EN SUBTIPOS CELULARES DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	106
13.1. Análisis de expresión por citometría de flujo.....	107
13.1.1. Estudio de expresión de MSR1 en poblaciones celulares de sangre completa	107
13.1.2. Estudio de expresión de MSR1 en poblaciones celulares de células mononucleares de sangre periférica	109
13.1.3. Análisis estadístico	109
13.2. Análisis de expresión por microscopía confocal.....	110

RESULTADOS	111
1. POBLACIONES DE ESTUDIO.....	113
1.1.Características demográficas	114
1.2.Características clínicas.....	114
2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA	116
2.1.Selección de genes de estudio	116
2.2.Análisis de la expresión génica por PCA.....	119
2.3.Análisis de expresión génica por <i>Heatmaps</i>	120
2.4.Expresión génica diferencial entre fenotipos clínicos	122
2.5.Expresión génica diferencial dependiendo de la gravedad asmática.....	123
2.6.Análisis de funcionalidad e interacción proteica	126
2.7.Análisis de sensibilidad y especificidad por curvas ROC	132
2.7.1. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos y grupo control.....	132
2.7.2. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos	137
3. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DEL GRUPO CON ASMA NO ALÉRGICA	139
4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL	141
4.1.Análisis de los niveles de expresión proteica.....	141
4.2.Análisis de sensibilidad y especificidad por curvas ROC	148
4.2.1. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos y grupo control y entre cada fenotipo asmático, en función de la gravedad	148
4.2.1.1. Análisis de biomarcadores individuales.....	148
4.2.1.1.1. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo control	148
4.2.1.1.2. Comparación entre los subgrupos de gravedad del asma	149
4.2.1.2. Análisis de biomarcadores combinados	151
4.2.1.2.1. Estudio de discriminación combinando dos biomarcadores.....	151
4.2.1.2.1.1. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo control.....	151
4.2.1.2.1.2. Comparación entre los subgrupos de gravedad del asma	156
4.2.1.2.2. Estudio de discriminación combinando tres biomarcadores	157
4.2.1.2.2.1. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo control.....	157
4.2.1.2.2.2. Comparación entre los subgrupos de gravedad del asma.....	160
4.2.1.3. Ranking del análisis por curvas ROC de la expresión proteica: comparaciones entre fenotipos clínicos y grupo control.....	162
4.2.1.4. Ranking del análisis por curvas ROC de la expresión proteica: comparaciones entre los subgrupos de gravedad del asma	166
4.2.2. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos	168
4.2.2.1. <i>Biomarcadores diferenciales entre el grupo con asma no alérgica y el grupo con asma alérgica</i>	168

4.2.2.2. Biomarcadores diferenciales entre el grupo con asma alérgica y el grupo con alergia sin asma	171
4.2.2.3. Ranking del análisis por curvas ROC de la expresión proteica: comparaciones entre fenotipos clínicos.....	173
5. ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE CORRELACIÓN.....	177
5.1. Análisis de correlación entre la expresión génica y proteica	177
5.2. Análisis de correlación entre la expresión génica y el porcentaje de metilación	179
5.3. Análisis de correlación de la expresión génica y proteica con los parámetros clínicos y de funcionalidad pulmonar.....	183
6. ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA DE MSR1	185
6.1. Análisis de MSR1 por citometría de flujo	187
6.1.1. Análisis de expresión proteica de MSR1: resultados totales	192
6.1.2. Análisis de expresión proteica de MSR1: resultados de subpoblaciones celulares estudiadas.....	195
6.2. Análisis de MSR1 por microscopía confocal.....	200
DISCUSIÓN	203
1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS BIOMARCADORES MÁS RELEVANTES	208
1.1. Biomarcador MSR1	208
1.2. Biomarcador SERPINB2	211
1.3. Biomarcador POSTN	212
1.4. Biomarcador PHLDA1.....	212
1.5. Biomarcador IL-10	213
1.6. Biomarcador CHI3L1	214
1.7. Biomarcador PI3.....	214
1.8. Biomarcador IL-8	215
2. ANÁLISIS DE METILACIÓN.....	216
3. PANELES DE BIOMARCADORES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE FENOTIPOS CLÍNICOS DEL ASMA Y LA ALERGIA.....	217
3.1. Paneles de biomarcadores génicos	218
3.2. Paneles de biomarcadores proteicos	219
CONCLUSIONES.....	225
BIBLIOGRAFÍA.....	229
ANEXO	255
ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL	257
PATENTE DERIVADA DE ESTA TESIS DOCTORAL	257
ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL.....	257

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de la reacción alérgica.....	52
Figura 2: Patogenia de la inflamación de las vías respiratorias en el asma	59
Figura 3: Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad	89
Figura 4: Análisis por PCA de la expresión génica global de la población de estudio 1	120
Figura 5: <i>Heatmaps</i> de los 94 genes.....	121
Figura 6: Gráficas de interacción proteica	130
Figura 7: Ejemplo de una curva ROC de un test excelente	132
Figura 8: Ejemplo de una curva ROC de un test pobre	134
Figura 9: Resultados del análisis de metilación.....	140
Figura 10: Comparación de la expresión proteica entre fenotipos clínicos, de los 9 potenciales biomarcadores analizados	142
Figura 11: Comparación entre los subgrupos de gravedad de asma, de la expresión proteica de los 9 potenciales biomarcadores.....	143
Figura 12: Ejemplo representativo del resultado de un <i>western blot</i> de MSR1	144
Figura 13: Ejemplo representativo del resultado de un <i>western blot</i> de SERPINB2.....	145
Figura 14: Ejemplo representativo del resultado de un <i>western blot</i> de PHLDA1	147
Figura 15: Ejemplo de histogramas obtenidos por citometría de flujo de las subpoblaciones en sangre.....	188
Figura 16: Ejemplo de histogramas obtenidos por citometría de flujo de las subpoblaciones en PBMC	190
Figura 17: Porcentajes totales de expresión proteica de MSR1 ⁺ en sangre completa	193
Figura 18: Porcentajes totales de expresión proteica de MSR1 ⁺ en PBMC.....	194
Figura 19: Expresión de MSR1 ⁺ en subpoblaciones celulares analizadas en sangre completa	
A) por fenotipos clínicos	196
B) por subgrupos de gravedad de enfermedad.....	197
Figura 20: Expresión de MSR1 ⁺ en subpoblaciones celulares analizadas en PBMC	
A) por fenotipos clínicos	198
B) por subgrupos de gravedad de enfermedad.....	199
Figura 21: Ejemplo representativo de una muestra marcada con fluorescencia para las subpoblaciones de PBMC A) CD4 ⁺ B) CD8 ⁺ C) CD19 ⁺ y D) CD14 ⁺ y la proteína MSR1	200

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Factores desencadenantes de asma.....	56
Tabla 2: Fenotipos asmáticos.....	63
Tabla 3: Clasificación del asma en función de la gravedad.....	64
Tabla 4: Tratamientos del asma con enfoques dirigidos por biomarcadores	75
Tabla 5: Tratamientos dirigidos por endotipos en asma de tipo Th2.....	76
Tabla 6: Clasificación de la gravedad de la limitación del flujo aéreo en EPOC	87
Tabla 7: Cebadores para el análisis cuantitativo de la metilación de las regiones seleccionadas por <i>Mass ARRAY EpiTYPER</i>	101
Tabla 8: Características de los anticuerpos utilizados en los análisis por <i>western blot</i>	104
Tabla 9: Características demográficas y clínicas de la población de estudio 1.....	113
Tabla 10: Características demográficas y clínicas de la población de estudio 2.....	113
Tabla 11: Listado de los 94 genes seleccionados	117
Tabla 12: Análisis de genes diferenciales.....	123
Tabla 13: Genes diferencialmente expresados en los fenotipos clínicos respecto al grupo control.....	124
Tabla 14: Anotación de <i>clusters</i> funcionales de los 26 genes diferencialmente expresados entre el grupo ANA y C	126
Tabla 15: Anotación de <i>clusters</i> funcionales de los 69 genes diferencialmente expresados entre el grupo AA y C.....	127
Tabla 16: Anotación de <i>clusters</i> funcionales de los 66 genes diferencialmente expresados entre el grupo AR y C	128
Tabla 17: Clasificación y categorización de los biomarcadores a nivel de expresión génica por el análisis de curvas ROC	135
Tabla 18: Clasificación y categorización de los biomarcadores a nivel de expresión génica por el análisis de curvas ROC. Comparación entre fenotipos clínicos.....	138
Tabla 19: Clasificación y categorización de los biomarcadores a nivel de expresión proteica por el análisis de curvas ROC. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo C.....	150
Tabla 20: Valores AUC del análisis de curvas ROC combinando la expresión proteica de dos biomarcadores.....	152
Tabla 21: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores.....	158
Tabla 22: Clasificación de los mejores biomarcadores proteicos individuales y combinados para cada comparación	162
Tabla 23: Valores AUC del análisis de curvas ROC individual y combinando la expresión proteica de dos biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos ANA y AA	170
Tabla 24: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos ANA y AA.....	171
Tabla 25: Valores AUC del análisis de curvas ROC individual y combinando la expresión proteica de dos biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos AA y AR	172

Tabla 26: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos AA y AR	173
Tabla 27: Clasificación de los mejores biomarcadores proteicos individuales y combinados para cada comparación. Comparación entre los fenotipos clínicos.....	174
Tabla 28: Análisis de correlación de la expresión génica y proteica de los diferentes biomarcadores.....	180
Tabla 29: Análisis de correlación entre la expresión génica, proteica y los parámetros clínicos	184
Tabla 30: Valores medios de las subpoblaciones celulares estudiadas en sangre completa....	186
Tabla 31: Valores medios de las subpoblaciones celulares estudiadas en PBMC	187

RESUMEN

DEFINICIÓN DE BIOMARCADORES DISCRIMINATORIOS DE FENOTIPOS CLÍNICOS EN ENFERMEDADES RESPIRATORIAS COMPLEJAS: ASMA Y ALERGIA

INTRODUCCIÓN

El asma y la alergia son enfermedades respiratorias crónicas que poseen un amplio espectro clínico, resultado de múltiples interacciones entre factores génicos y medioambientales. La atopia y los mecanismos alérgicos se ha demostrado que están implicados en un 50-80 % de los casos asmáticos, y en aproximadamente un 50 % de los pacientes con asma grave.

Los mecanismos del asma son complejos y se caracterizan por la inflamación de las vías respiratorias basados en citocinas. La activación de células T cooperadoras de tipo 2 (Th2) específicas de alérgeno y de células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2) son las responsables de la inflamación eosinofílica. Estas respuestas de la inflamación de las vías respiratorias provocada por células Th2 e ILC2 constituyen las vías principales de la enfermedad en los pacientes con asma Th2-alta. Sin embargo, otras células importantes, las células Th17, originan el reclutamiento de neutrófilos. Esta vía podría ser la más relevante en pacientes con asma Th2-baja.

La clasificación del asma aún no está clara y la descripción de endotipos bien definidos es necesaria. Para identificar las subpoblaciones de pacientes (fenotipos), es necesario el descubrimiento de los mecanismos subyacentes de las diferentes formas de una enfermedad (endotipos) mediante el uso de biomarcadores. El aumento de las nuevas técnicas de estudio masivo, ha permitido a los investigadores definir nuevos biomarcadores que deberían ser validados. Los biomarcadores disponibles para el uso clínico son pocos y se centran principalmente en el asma Th2-alta. Actualmente no hay biomarcadores específicos de asma mediada por una respuesta Th2-baja, por lo que su búsqueda es una necesidad real en clínica.

OBJETIVO

El objetivo de esta Tesis fue analizar el potencial de 94 biomarcadores moleculares y definir su capacidad de discriminación entre las enfermedades asmáticas y alérgicas en muestras derivadas de sangre, en una población bien definida clínicamente, además de su relación con la gravedad de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La expresión de 94 genes, seleccionados de trabajos publicados anteriormente, se estudió en una población de 104 sujetos: 30 sujetos control (C), 30 pacientes con asma no alérgica (ANA), 30 pacientes con asma alérgica (AA) y 14 pacientes con alergia (rinitis) sin asma (AR). En los 2 grupos de pacientes con asma, un 50 % mostraron asma grave y el otro 50 %, un diagnóstico moderado-leve. Para ello, se extrajo el ARN de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de todos los sujetos, por el método del *Trizol* y se analizó por qRT-PCR. El análisis de la expresión génica diferencial se realizó por *multiple testing*. La relevancia se definió por la cuantificación relativa (RQ) y el valor *p* ajustado ($< 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *StatMiner*. Para el estudio epigenético de metilación, se analizó el ADN extraído de las PBMC (por *Trizol*) mediante la amplificación de las islas CpG cercanas a la región del promotor de *MSR1* (5 islas CpG), *SERPINB2* (5), *PHLDA1* (35), *CHI3L1* (8) y *PI3*(5). El estudio de metilación se realizó por el método *Sequenom EpiTYPER*.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo utilizando las técnicas de ELISA (en suero) o de *western blot* (en proteína extraída de PBMC por el método *Trizol*) dependiendo de la naturaleza del biomarcador. La sensibilidad y especificidad de la expresión génica y proteica de varios biomarcadores candidatos para la diferenciación de los 4 grupos de la población (y de los subgrupos de gravedad) se realizó por el análisis de curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*) utilizando el programa R. Además, se estudió la expresión génica y proteica para establecer correlaciones con los parámetros funcionales y clínicos.

El análisis estadístico de las diferencias en el porcentaje de metilación y en los niveles proteicos y el análisis de correlación se realizaron utilizando el programa *GraphPad InStat 3*.

RESULTADOS

La expresión de los 94 genes analizados mostró buena sensibilidad y especificidad para discriminar los diferentes grupos clínicos de estudio. El análisis de la expresión génica entre los grupos clínicos y el grupo control mostró distintos grupos de genes con diferencias estadísticamente significativas. Además, el análisis según la gravedad de la enfermedad reveló 9 genes, 4 sobreexpresados *IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1*, *SERPINB2* y 5 reprimidos *CHI3L1*, *CPA3*, *IL-8*, *IL-1R2* y *PI3*, asociados con los fenotipos de asma grave o moderada-leve. *MSR1*, *PHLDA1*, *CHI3L1* y *PI3* mostraron diferencias estadísticamente significativas en los perfiles de metilación entre pacientes con ANA y sujetos C. En los pacientes con AA, 35 genes estaban reprimidos en los sujetos con diagnóstico grave y moderado-leve al compararlos con el grupo C.

El análisis de expresión proteica de los genes asociados a gravedad (excepto *CPA3* e *IL-1R2*), además de POSTN (como marcador de respuesta Th2) reveló diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CHI3L1, IL-8, POSTN, SERPINB2 y MSR1, entre los grupos clínicos y la gravedad del asma. También se observaron diferencias en la expresión de MSR1, al analizar su presencia por citometría de flujo en sangre y en PBMC, especialmente en subpoblaciones celulares específicas.

En el análisis por curvas ROC, cada gen individual mostró buena sensibilidad y especificidad para discriminar algunos de los fenotipos. Sin embargo, se observaron combinaciones interesantes de 2 o 3 biomarcadores proteicos para discriminar la enfermedad asmática y alérgica, y entre los distintos fenotipos de dichas patologías, con técnicas fáciles de reproducir. Se encontraron varias correlaciones interesantes entre los porcentajes de metilación, la expresión génica, los niveles proteicos y los parámetros clínicos y de funcionalidad.

CONCLUSIONES

Como conclusión general, se han definido paneles génicos y proteicos, compuestos por biomarcadores individuales y combinados, en muestras fáciles de obtener y por técnicas estandarizadas, que podrían ser útiles para caracterizar los distintos fenotipos de asma y alergia, pero sobre todo, para discernir distintos fenotipos clínicos entre sí, así como, la gravedad de la enfermedad asmática. Destacan además, los paneles diferenciales del fenotipo ANA por aportar nuevos biomarcadores para este tipo de asma, que dispone en la actualidad de muy pocas dianas para su diagnóstico y pronóstico.

SUMMARY

DEFINITION OF DISCRIMINATORY BIOMARKERS OF CLINICAL PHENOTYPES IN COMPLEX RESPIRATORY DISEASES: ASTHMA AND ALLERGY

BACKGROUND

Asthma and allergy are complex chronic respiratory diseases that include a wide clinical spectrum, which is a result from multiple interactions between genetic and environmental factors. Atopy and allergic mechanisms have been demonstrated to be implicated in 50-80 % of the asthmatic cases, and in approximately a 50 % of patients with severe asthma.

The mechanistic drivers of asthma are complex and are characterized by cytokine-based airway inflammation. The activation of allergen-specific T helper 2 (Th2) cells and of innate lymphocytes cells 2 (ILC2) are responsible for the eosinophilic inflammation. Airway inflammation driven by Th2 cells and ILC2 cells constitute the main pathways in patients with Th2-high asthma. However, other important T lymphocytes, the Th17 cells, cause neutrophil recruitment. This pathway could be the most relevant in patients with Th2-low asthma.

The classification of asthma is still not clear and the definition of well-defined endotypes is necessary. In order to identify subpopulations of patients (phenotypes), it is necessary to discover the underlying mechanisms of the different forms of a disease (endotypes) by the use of biomarkers. The increase of new high-throughput technologies has enabled researchers to describe several new potential biomarkers that need to be validated. Biomarkers available for clinical use are only few and mainly reflect Th2-high asthma. Nowadays, there are no specific biomarkers for Th2-low asthma, so their search is an unmet clinical need.

OBJECTIVE

The aim of this Thesis was to analyse the potential of 94 molecular biomarkers and define their capacity to discriminate between asthmatic and allergic diseases in samples derived from whole blood, in a population well-defined clinically, as well as their relationship with the severity of the disease.

MATERIAL AND METHODS

The expression of ninety four genes selected from gene-studies previously published, were analysed by qRT-PCR, in a population of 104 unrelated subjects: 30 healthy control subjects (C), 30 patients with nonallergic asthma (NA), 30 patients with allergic asthma (AA) and 14 patients

with allergy (rhinitis) without asthma (AR). In the 2 groups with patients with asthma, a 50 % of subjects had a severe condition and the other 50 %, a moderate-mild diagnosis. To accomplish this, RNA was extracted from the subject's peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of all the subjects, by the Trizol procedure and was analysed with qRT-PCR. The analysis of differential gene-expression was performed by multiple testing. Relevance was defined by relative quantification (RQ) and the corrected p value (<0.05). Statistical analyses were performed by StatMiner program. For the epigenetic study of methylation, DNA extracted from PBMCs (by Trizol) was amplified in CpG islands near the promotor region of *MSR1* (5 CpG islands), *SERPINB2* (5), *PHLDA1* (35), *CHI3L1* (8), and *PI3* (5). The methylation study was done following the Sequenom EpiTYPER approach.

Protein quantification was carried out using ELISA (in sera) or by western blot (proteins extracted from PBMCs by the Trizol procedure), depending on the biomarker. The sensibility and specificity of the gene and protein expression of several candidate biomarkers for differentiating the 4 groups of the population (and the severity subgroups) was performed by receiver operating characteristic curve (ROC) analysis using the R program. Moreover, the gene and protein expression was also studied to establish correlations with functional and clinical parameters.

The statistical analysis of the differences in the percentages of methylation and in the protein levels and the correlation analysis were done using the Graph-Pad InStat 3 program.

RESULTS

The expression of the 94 genes studied showed a good sensibility and specificity to discriminate the clinical of the population. The analysis of gene-expression between clinical groups and control subjects revealed different sets of genes with statistically significant differences: 26 genes in NA, 69 in AA and 66 in AR. Furthermore, the analysis according to the disease's severity revealed nine genes, *IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1*, *SERPINB2* overexpressed and *CHI3L1*, *CPA3*, *IL-8*, *IL-1R2* y *PI3* underexpressed, associated with the severe or moderate-mild nonallergic asthma phenotypes. *MSR1*, *PHLDA1*, *CHI3L1*, and *PI3* showed a statistically significant difference in their methylation profile between patients with ANA and controls. In patients with allergic asthma, 35 genes were underexpressed in severe and moderate-mild subjects when compared to the C group.

The protein expression of the genes associated with the severity of asthma (except *CPA3* and *IL-1R2*), in addition to POSTN (biomarker of Th2 response) showed statistically significant

differences in the levels of MSR1, SERPINB2, IL-8, CHI3L1 and POSTN, between the clinical groups and the severity groups of asthma. Differences were also observed in the expression of MSR1 when its presence was measured in blood and PBMCs by flow cytometry, especially in specific cellular populations of PBMC.

In the ROC curve analysis, single genes showed a good sensitivity and specificity to discriminate some of the phenotypes. However, interesting combinations of two or three protein biomarkers were found to distinguish the asthma and allergic diseases between the different phenotypes of this pathologies using easy to measure techniques. Several interesting correlations between methylation percentage, gene expression, protein levels, and functional and clinical parameters have been defined.

CONCLUSIONS

As a general conclusion, gene and protein panels formed by single and combinations of biomarkers have been defined in easy to obtain samples and by standardized techniques, that could be useful to characterise phenotypes of asthma and allergy, but specially, to differentiate clinical phenotypes and the severity of the asthmatic disease as well. Furthermore, relevant are the differential panels of the phenotype ANA given that they contribute with new biomarkers for this type of asthma that at the moment has very few targets for its diagnosis and prognosis.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

- **18S** Subunidad de 18 unidades *Svedberg* del ribosoma
- **AA** Asma alérgica
- **ADN** Ácido desoxirribonucleico
- **ANA** Asma no alérgica
- **APC** Célula presentadora de antígenos
- **AR** Alergia rinitica no asmática
- **ARLT** Antagonista del receptor para leucotrienos
- **ARN** Ácido ribonucleico
- **AUC** Area bajo la curva
- **BSA** Albúmina de suero bovino
- **CCL** Ligando del receptor para quimiocinas CC
- **CCR** Receptor para quimiocinas CC
- **CD** Cúmulo/*cluster* de diferenciación. Marcador de superficie
- **CpG** Citosina-fosfato-guanina
- **CR** Cuantificación relativa, expresión proteica
- **CRTH2** Receptor para quimiocinas homólogo a una molécula expresada en los linfocitos T cooperadores de tipo 2
- **Ct** Ciclo umbral
- **CXCL** Ligando del receptor para quimiocinas CXC
- **Cys-LT** Leucotrieno cisteínico
- **DAVID** Base de datos de genes para la anotación, visualización y descubrimiento integrado (*Database for Annotation, visualization and integrated Discovery*)
- **DC** Célula dendrítica
- **ELISA** Análisis inmunoabsorbente ligado a enzima
- **EPOC** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **E.S.** Valor de enriquecimiento (*Enrichment score*)
- **FACS** Flujo de recuento de células activado por fluorescencia (*Fluorescence-Activated Cell Sorting Flow*)
- **FEM** Flujo espiratorio máximo
- **FE_{NO}** Fracción exhalada de óxido nítrico
- **FEV₁** Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
- **FITC** Isotiocianato de fluoresceína

- **FVC** Capacidad vital forzada
- **GAPDH** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **GCI** Glucocorticoide inhalado
- **GEMA** Guía Española del Manejo del Asma
- **GOLD** Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- **HRB** Hiperreactividad bronquial
- **IC95%** Intervalo de confianza del 95 %
- **IFN- γ** Interferón γ
- **IgE** Inmunoglobulina de tipo E
- **IL** Interleucina
- **LABA** Agonista β_2 adrenérgico de acción larga
- **mAb** Anticuerpo monoclonal
- **NK** Célula *natural killer*
- ***p*** *p* valor estadístico
- **PBMC** Células mononucleares de sangre periférica
- **PBS** Tampón fosfato salino
- **PC7** Ficoeritrina cianina 7
- **PCA** Análisis de componentes principales
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PE** Ficoeritrina
- **PG** Prostaglandina
- **qRT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
- **ROC** *Receiver Operating Characteristic*
- **RQ** Cuantificación relativa, expresión génica
- **SABA** Agonista β_2 adrenérgico de acción corta
- **SI** Sistema inmune
- **SNP** Polimorfismo de un nucleótido único
- **STRING** Herramienta de búsqueda de interacción de genes/proteínas (*Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins*)
- **TGF- β** Factor de crecimiento transformador β
- **Th** Célula T cooperadora
- **Th0** Célula T cooperadora virgen o *naive*

- **Th1** Célula T cooperadora de tipo 1
- **TNF** Factor de necrosis tumoral
- **Treg** Célula T reguladora

INTRODUCCIÓN

El asma y muchas de las enfermedades alérgicas son patologías respiratorias inflamatorias crónicas, comunes, complejas y heterogéneas, razones por las que tanto su evolución clínica como su respuesta al tratamiento, no siempre son predecibles. Son enfermedades que se relacionan mucho entre sí. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC es otra patología respiratoria que en ocasiones solapa y comparte patogenia y síntomas con el asma. Todas estas enfermedades son patologías respiratorias obstructivas cuya relevancia e impacto en la salud mundial está aumentando cada vez más. Aun así son enfermedades muy heterogéneas clínicamente hablando por lo que su clasificación no está clara y por eso, en vez de catalogar la enfermedad por el fenotipo clínico, cada vez son más los especialistas que abogan por definir este tipo de enfermedades por endotipos. Entendemos por fenotipo como las características observables (clínicas, fisiológicas, morfológicas, bioquímicas y respuesta al tratamiento) sin una relación con la fisiopatología subyacente y por endotipo, un subtipo de una enfermedad que se define funcional y patológicamente por un mismo mecanismo molecular. Para definirlos, es necesario el desarrollo de biomarcadores que discriminen este tipo de enfermedades y su gravedad para su correcto diagnóstico y tratamiento, y por lo tanto, cura. A continuación se definen las enfermedades de la alergia, asma y EPOC y se trata el tema actual de los biomarcadores que existen y las técnicas para encontrarlos.

1. RESPUESTA INMUNE FRENTE A ANTÍGENOS EXÓGENOS

El papel del sistema inmune (SI) es proteger al organismo de patógenos dañinos y tolerar antígenos propios y extraños que no producen daño en el individuo. Sin embargo, la alteración de la tolerancia o, la desregulación del funcionamiento del SI, implica el desarrollo de enfermedades de origen autoinmune (respuesta ante un antígeno propio) o alérgicas (respuesta ante un antígeno extraño) (Soyer *et al.*, 2013; Kucuksezer *et al.*, 2013). La respuesta del SI ante un antígeno ambiental inocuo sería tolerogénica, si hay ausencia de respuesta, y alérgica, si la reacción es de hipersensibilidad o exagerada, dando lugar al aumento de células T cooperadoras o *helper* de tipo 2 (Th2) y a la producción de inmunoglobulinas de tipo E (IgE) (Barnes, 2011).

1.1. Respuesta tolerogénica

La tolerancia inmunológica se define como la ausencia específica de respuesta ante el antígeno (tolerógeno). Se controla por diferentes mecanismos de supresión activa conferidos de especificidad y memoria. La respuesta tolerogénica frente a antígenos extraños se desarrolla a nivel periférico. Los principales mecanismos que controlan este tipo de respuesta son la delección clonal y la anergia clonal, definiéndose la primera como la inducción de la muerte celular por

apoptosis y la segunda, como la inactivación funcional prolongada o irreversible de los linfocitos. También es posible perder la capacidad de respuesta frente a un antígeno, aun habiendo linfocitos maduros inmunocompetentes que responden a él, mediante distintos mecanismos, entre los que destacan los que implican a células y citocinas reguladoras (Sakaguchi, Wing y Yamaguchi, 2009; Soyer *et al.*, 2013).

1.2. Enfermedad alérgica

Las enfermedades alérgicas son reacciones adversas del SI frente a sustancias teóricamente inocuas llamadas alérgenos. Como destaca La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI de sus siglas en inglés) (2016), la alergia es un problema de salud pública hoy en día de proporciones pandémicas, que afecta a más de 150 millones de personas en Europa y cuya prevalencia está aumentando de forma variable según el estilo de vida. Estos datos evidencian que la alergia es la enfermedad crónica más común. Siguiendo la tendencia epidemiológica, la EAACI estima que más de la mitad de la población europea sufrirá algún tipo de alergia en el 2025. Supone un problema económico debido a la menor productividad de los sujetos afectados y el importante porcentaje que se abstiene laboralmente, además del gasto para los sistemas de salud pública. Esta alta prevalencia e impacto en la calidad de vida se calcula que representan más de 100 millones de días de absentismo laboral o escolar al año (EAACI, 2016).

1.2.1. Factores desencadenantes: alérgenos

Se denomina alérgeno a aquella proteína o glicoproteína que induce la producción de anticuerpos IgE específicos en sujetos susceptibles a desarrollar una respuesta clínica, es decir, una enfermedad alérgica (Pomés y Villalba, 2007). Si bien las bases moleculares que determinan que una proteína sea alérgica o no, no están muy bien definidas, la capacidad de una proteína de desencadenar una respuesta alérgica se asocia con su grado de penetración en el organismo (Pomés y Villalba, 2007). Así pues, deben ser proteínas solubles y estables en fluidos corporales. La mayoría tienen un tamaño entre 2 y 70 kDa, tamaño óptimo para que la molécula sea inmunogénica y pueda atravesar la membrana de las mucosas (Lowenstein, 1985). Otras propiedades biológicas como la actividad enzimática o parámetros físico-químicos pueden contribuir a aumentar la capacidad alérgica de una molécula (Shakib y Furmonaviciene, 2000). Además, hay que tener en cuenta las vías de contacto de los alérgenos con el organismo de un individuo que pueden ser varias: inhalación (aeroalérgenos), ingestión (alérgenos alimentarios), inyección o por contacto y, dependiendo de la vía, la clínica que se desarrollará será diferente.

Una consideración general de la sensibilización frente a fuentes alérgicas es que el extracto proteico natural puede contener más de un alérgeno, es decir, más de una proteína capaz de inducir una respuesta alérgica, hecho que no significa que todos los alérgenos presenten la misma frecuencia de reconocimiento por parte de los anticuerpos IgE de los individuos afectados por esta enfermedad. Los alérgenos se clasifican como principales o secundarios, siendo los alérgenos principales aquellos reconocidos por más del 50% de los pacientes y secundarios, los reconocidos por menos del 50 % (King, Norman y Conell, 1964). Una determinada fuente alérgica puede contener más de un alérgeno principal.

1.2.2. Patogenia

Por causas no conocidas, se produce una pérdida de tolerancia frente a sustancias ambientales inocuas, produciéndose la activación del SI y la generación de una respuesta inmunogénica defensiva y exagerada. A esta reacción inapropiada se la conoce como alergia, término otorgado por el Dr. Clemens Von Pirquet en 1906 y la molécula ambiental inocua que origina esta respuesta se denomina alérgeno. Hoy en día, no se conocen las razones exactas por las que la exposición a un antígeno ambiental, supuestamente tolerogénico, da lugar a una respuesta alérgica, también denominada hipersensibilidad de tipo I. Los estudios muestran que la susceptibilidad para desarrollar enfermedades alérgicas, depende por un lado de la predisposición hereditaria y por otro de su exposición a factores ambientales, estos en gran medida relacionados con el estilo de vida del sujeto y a su entorno.

La hipersensibilidad de tipo I se origina con la interacción entre el antígeno y los anticuerpos IgE unidos a células como mastocitos y basófilos, que provocan la liberación de mediadores inflamatorios. Este proceso se resume en la Figura 1.

Tras una primera exposición a un alérgeno, se produce una captación de éste por parte de unas células llamadas células presentadoras de antígenos (APC del inglés *antigen-presenting cell*), que lo procesan en su interior y lo presentan a los linfocitos T vírgenes (*naïve* o Th0) que se diferencian en células Th2, que con la producción de interleucina 4 (IL-4) e IL-13 y la interacción con los linfocitos B, provocan la producción por parte de estos últimos de IgE específica frente a ese alérgeno concreto y así, se generarán poblaciones de linfocitos B de memoria IgE específicos. Durante todo este proceso, el sujeto no experimenta ningún síntoma y puede estar varios días, meses o años asintomático. Este proceso se denomina sensibilización (Figura 1A), fase fundamental para desarrollar la enfermedad alérgica, aunque hay que tener en cuenta que es imposible presentar síntomas en este primer contacto con el alérgeno. En un contacto posterior (Figura 1B), el alérgeno será reconocido directamente por los anticuerpos IgE específicos frente a

ese alérgeno, que ya habían sido secretados por los linfocitos B en ese primer contacto, y que ahora se encuentran unidos a los receptores de alta afinidad para la IgE (FcεRI) en la superficie de los mastocitos y basófilos. Tras esa unión, los mastocitos y basófilos liberarán el contenido de sus gránulos, llenos de histamina y otras sustancias con gran capacidad inflamatoria. Como consecuencia de la liberación de estas sustancias, el sujeto sensibilizado empezará a notar los síntomas típicos de la reacción alérgica, a los 20-30 minutos aproximadamente tras haberse expuesto al alérgeno. Esta reacción alérgica rápida, técnicamente se denomina reacción de hipersensibilidad inmediata o reacción alérgica aguda.

De cuatro a seis horas después de esta reacción inflamatoria inmediata se produce la denominada reacción alérgica tardía. En este caso no se precisa del alérgeno, y ocurre básicamente porque las sustancias liberadas por los mastocitos (en los tejidos) y los basófilos (en el torrente sanguíneo) atraen al lugar de la inflamación principalmente a los eosinófilos, cuyo contenido (inicialmente diseñado para destruir parásitos) crea un daño e inflamación crónica perpetuando así los síntomas (Zubeldía *et al.*, 2012).

La Figura 1 detalla en mayor profundidad la reacción alérgica inmediata y la tardía. Los mastocitos y basófilos parecen jugar un papel crítico en la iniciación de la inflamación alérgica de las vías respiratorias, como ya se ha comentado, por la activación directa producida por alérgenos. Esta activación se lleva a cabo mediante mecanismos mediados por moléculas de IgE que se encuentra en la superficie de estas células. Esto da lugar a la rápida liberación de mediadores que dan lugar a los síntomas típicos de la alergia. Los alérgenos inhalados activan a mastocitos y basófilos sensibilizados, para así liberar diversos mediadores de aminas vasoactivas como la histamina, mediadores lipídicos broncoconstrictores como la prostaglandina D2 (PGD2) y los leucotrienos cisteinílicos (cys-LT) entre otros, ligandos del receptor para quimiocinas CXC (por ejemplo CXCL8 y CXCL10) y de quimiocinas CC (como CC del ligando 2 (CCL2), CCL4 y CCL5) y otras citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13). Por otro lado, tras el contacto con el alérgeno, las células epiteliales de los tractos respiratorios, liberan el factor de células madre (SCF del inglés *stem cell factor*), que es importante para mantener a los mastocitos de la mucosa en las vías respiratorias o en la superficie de la piel. Los alérgenos son procesados por células dendríticas o DC (del inglés *dendritic cells*) (son las principales APC), que condicionadas por la linfopoyetina del estroma del timo (TSLP) (secretada por células epiteliales y mastocitos), liberan CCL17 y CCL22, que a su vez actúan sobre el receptor 4 para quimiocinas CC (CCR4) para atraer células Th2. Las células Th2 tienen un papel central dirigiendo la respuesta inflamatoria de la alergia a través de la producción de varias citocinas esenciales: IL-4 e IL-13, que estimulan a los linfocitos B para sintetizar IgE; IL-5, que es necesaria para la inflamación mediada por eosinófilos; y la IL-9, que

estimula la proliferación de mastocitos. Las células epiteliales a su vez liberan CCL11 que atrae eosinófilos mediante el receptor CCR3 (Barnes, 2011).

En la respuesta tardía (Figura 1C) recae la responsabilidad de la propagación y el mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa Th2. Las quimiocinas y citocinas liberadas durante la respuesta inmediata por las células efectoras, dirigen el reclutamiento de mastocitos, basófilos, eosinófilos y células Th2 específicas de alérgeno a los sitios de entrada del alérgeno, lo que deriva en una inflamación local y daño tisular (Carlson *et al.*, 1992). Estas se reactivan y se produce la expansión clonal. La IgE local facilita la presentación antigénica, incrementando la activación celular. Los eosinófilos son uno de los tipos celulares con mayor capacidad inflamatoria. Las células T cooperadora de tipo 1 (Th1) producen interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), contribuyendo a la apoptosis de los queratinocitos, del epitelio bronquial y de las células del músculo liso (Larché, Akdis y Valenta, 2006). Los pacientes alérgicos pueden tener un defecto en las células T reguladoras (Treg), lo que favorece la prolongada activación de células Th2. Las células Treg intervienen en la supresión de la inflamación alérgica mediante la secreción de diversas citocinas reguladoras como la IL-10 o por contacto célula-célula (Palomares *et al.*, 2010).

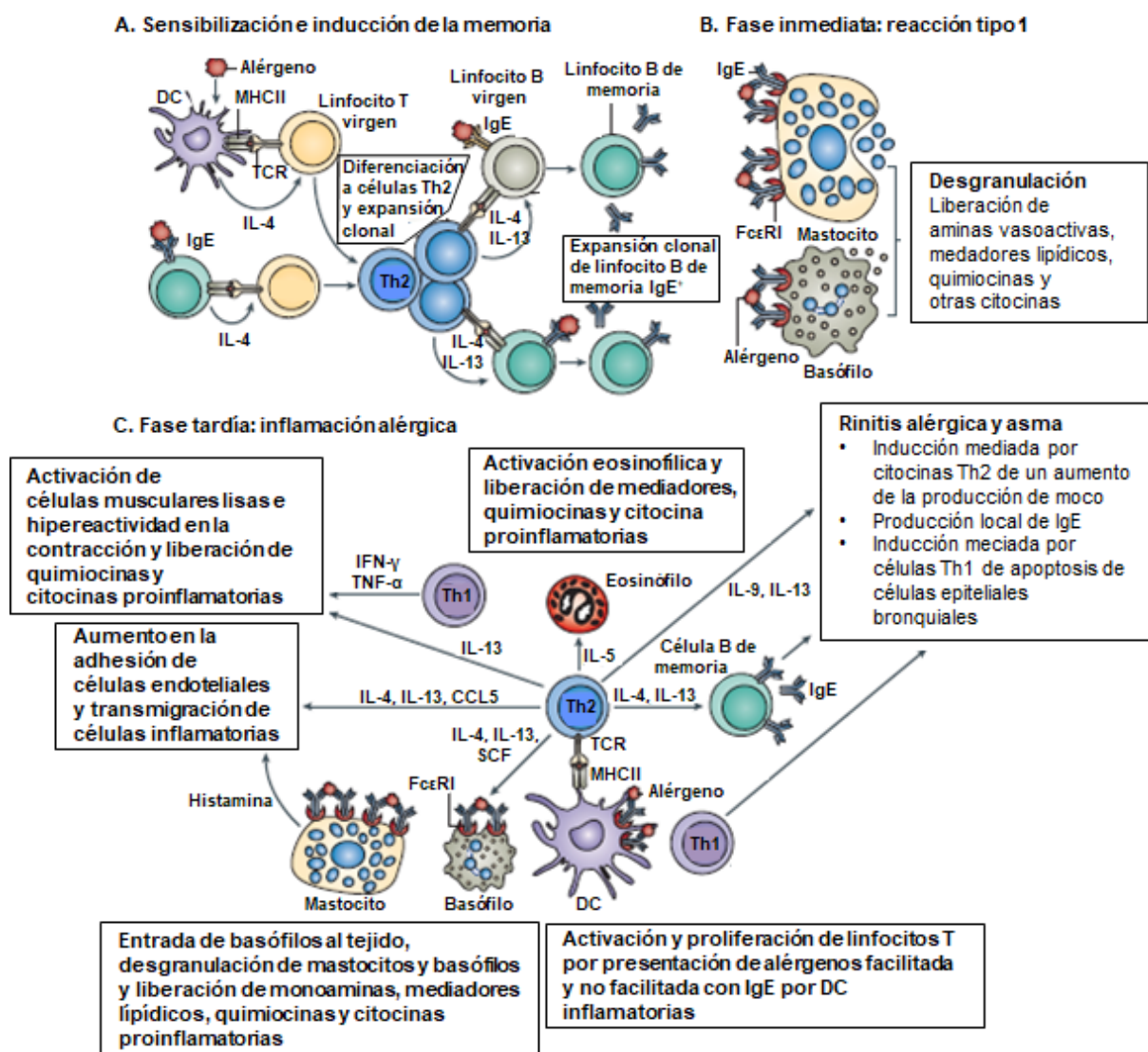


Figura 1: Mecanismos de la reacción alérgica. A) Sensibilización e inducción de linfocitos B y T de memoria específicas de alérgeno. La exposición al alérgeno e interleucina 4 (IL-4) activan la diferenciación y expansión de células vírgenes a células Th2 específicas del alérgeno. Las células Th2 junto con IL-4 e IL-13 dan lugar a su vez a la diferenciación y expansión clonal de linfocitos B específicos de alérgeno que exponen el anticuerpo de la inmunoglobulina E (IgE) en su superficie para facilitar la presentación antigénica. B) Fase inmediata: reacción tipo 1. El entrecruzamiento de los receptores FcεRI por la unión del anticuerpo IgE con el alérgeno provoca la liberación de aminas vasoactivas (como la histamina), mediadores lipídicos, quimiocinas (ligandos de receptores para quimiocinas CXC: CXCL8 y CXCL10 y de quimiocinas CC: CCL2, CCL4 y CCL5) y otras citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13). C) Fase tardía: inflamación alérgica. Los linfocitos T específicos de alérgeno migran al lugar de exposición del alérgeno atraídos por quimiocinas y otras citocinas y son reactivados y proliferan. Esta activación se incrementa por la presentación local del alérgeno facilitada por IgE a través de células dendríticas (DC). MHCII: molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad; TCR: receptor de linfocito T; SCF: factor de células madre (Figura adaptada de Larché, Akdis y Valenta, 2006).

1.2.3. Síntomas, diagnóstico y tratamiento

Las reacciones alérgicas pueden ser localizadas (rinitis, asma, etc...) o generalizadas (reacción anafiláctica) dependiendo de la vía de acceso y el grado de difusión. Además, las manifestaciones clínicas derivadas del proceso alérgico son diversas, ya que dependen del agente causal, ya sean aeroalérgenos, alimentos, medicamentos o veneno por picaduras de himenópteros, y del órgano afectado. Así, en la piel, el contacto con un determinado alérgeno puede producir urticaria o dermatitis caracterizada por la aparición de eritema, angioedema y prurito. En los bronquios producen broncoespasmo, inflamación y aumento de secreciones, característicos del asma, mientras que en la mucosa nasal, producen inflamación y prurito, que originará estornudos, así como aumento de secreción mucosa propio de la rinitis y otros síntomas extranasales como conjuntivitis alérgica y picor en los ojos y en el paladar. En el tracto digestivo causa diarrea, vómitos y dolor abdominal, síntomas que aparecen en la alergia alimentaria. En los casos más graves, el alérgeno puede afectar a varios órganos provocando una reacción anafiláctica.

Esta Tesis se centra en la alergia causada por aeroalérgenos. El diagnóstico de la alergia se realiza a través de una exploración clínica, evaluando la presencia de sintomatología alérgica, principalmente asma y/o rinitis. Además, se deben realizar pruebas cutáneas, mediante la prueba intraepidérmica (o *skin prick test*) que permite diagnosticar frente a qué sustancia está sensibilizado un determinado individuo y cuantificación de los niveles de IgE total e IgE específica en suero. El planteamiento general para el manejo de un paciente con alergia es evitar en la medida de lo posible el alérgeno causante. Las pruebas cutáneas y los niveles de IgE específica pueden no solo ayudar a la hora de evitar el contacto directo con el alérgeno, sino también para mejorar el plan del tratamiento para que, por ejemplo para los aeroalérgenos estacionales, en la época en la que el alérgeno se encuentra en sus niveles más altos en el aire, se pueda conseguir una terapia efectiva. En cuanto al tratamiento, los medicamentos suministrados solo consiguen aliviar los síntomas de los pacientes, salvo la inmunoterapia específica con alérgeno (AIT) que es la única que modifica el curso de la enfermedad. Algunos de los medicamentos más utilizados son los antihistamínicos orales o intranasales (antagonistas de los receptores H1) que bloquean la liberación de histamina y así, sus consecuencias. También se utilizan corticosteroides nasales, que tienen un potente efecto antiinflamatorio local y, como último recurso, también existen corticoides sistémicos para tratar síntomas muy graves (*World Allergy Organization*, 2015).

La AIT consiste en la administración repetida de extractos alérgicos (enriquecidos en el o los alérgenos causantes de la respuesta alérgica) habitualmente de forma subcutánea a un individuo alérgico, con el fin de inducir una tolerancia inmunológica y clínica, para así aliviar los síntomas y

mejorar su calidad de vida tras una exposición posterior y natural al alérgeno. Este tipo de terapia se ha demostrado que modifica las causas subyacentes de la enfermedad provocando beneficios a largo plazo (Akdis, 2010).

2. ENFERMEDAD ASMÁTICA

El asma bronquial es una enfermedad crónica inflamatoria de las vías respiratorias que provoca hiperreactividad bronquial (excesivo estrechamiento del calibre de las vías respiratorias) y/o obstrucción del flujo de aire caracterizado por síntomas como tos, sibilancias o disnea (Pawankar *et al.*, 2011). La Organización Mundial de la Salud (2017) lo define como la enfermedad crónica más común en niños y se estima que hay alrededor de 235 millones de sujetos afectados de todas las edades en el mundo. De éstos, aproximadamente un 10% muestran una clínica de asma grave, con una importante morbilidad y mortalidad (*The ENFUMOSA Study Group*, 2003; McKeage, 2013). Según el informe de la Iniciativa Global para el Asma (*Global Initiative for Asthma* o GINA) (2018) se define como "una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por inflamación crónica de las vías respiratorias". Se caracteriza por la historia de síntomas respiratorios como sibilancias, falta de aire, opresión torácica y tos que varían en intensidad con el tiempo y se asocia a una limitación variable del flujo aéreo espiratorio.

2.1. Factores de riesgo

Para el desarrollo del asma, se debe tener en cuenta la distinción entre los factores de riesgo y los factores desencadenantes de síntomas. Los factores de riesgo son aquellos que se asocian con la aparición de la enfermedad asmática. Por otro lado, los factores desencadenantes de síntomas del asma son aquellos cuya exposición da lugar a síntomas asmáticos en pacientes, pudiendo llegar a causar una exacerbación del asma.

Los factores de riesgo para el desarrollo de asma más estudiados o con mayor grado de asociación se relacionan con factores perinatales como la prematuridad (Been *et al.*, 2014), la lactancia (considerado un factor protector) (Silvers *et al.*, 2012), cesárea (Tollånes *et al.*, 2008) o el tabaco en la gestación (Neuman *et al.*, 2012), mientras que los factores ambientales (aeroalérgenos, alérgenos laborales, infecciones respiratorias y tabaquismo) son muy variables pudiendo ser a su vez, algunos o a veces, protectores (Kerkhof *et al.*, 2009; Illi *et al.*, 2001) y pueden intervenir en las distintas edades del sujeto. El uso de antibióticos (Marra *et al.*, 2006) y factores propios del huésped, como la atopia (Arbers *et al.*, 2007) o la rinitis (Burgess *et al.*, 2007), son también factores de riesgo para el asma.

En cuanto a los factores desencadenantes de síntomas, su importancia radica en que evitarlos es esencial para la mejora de la enfermedad asmática. La Tabla 1 (Comité Ejecutivo de la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA), 2017) recoge los factores más frecuentes. Curiosamente, cuando uno se expone en la infancia a algunos de los factores ambientales que son reconocidos desencadenantes, se observa que se comportan como factores protectores para el desarrollo de la enfermedad. Esto es la base de la hipótesis de la higiene, que plantea que la infección, el contacto con endotoxinas en condiciones de baja exposición, y/o la exposición a animales (entre otros factores) en edades tempranas puede prevenir el desarrollo de enfermedades alérgicas. El primer mecanismo propuesto para la hipótesis de la higiene estaba basado en la dicotomía Th1 y Th2. Actualmente, la visión de esta hipótesis está cambiando ya que el desequilibrio Th1 frente a Th2 no está claro (Cárdaba, 2015). El cambio del planteamiento inicial enfatiza el potencial papel de los linfocitos T reguladores como dianas y mediadores de los cambios ambientales debidos al estilo de vida occidental (Vercelli, 2003; Wills-Karp, Santeliz y Karp, 2001; Yazdanbakhsh, Kremsner y van Ree, 2002).

Tabla 1: Factores desencadenantes de asma

FACTORES AMBIENTALES	ATMOSFÉRICOS	POLUCIÓN	- SO ₂ - NO ₂ - Ozono - CO
		VEGETALES	- Partículas en suspensión - Polen de gramíneas - Polen de árboles - Polen de malezas
	DOMÉSTICOS	- Ácaros del polvo - Epitelio de gato	- Epitelio de perro - Cucaracha
	AGENTES INFECCIOSOS	HONGOS	- <i>Alternaria alternata</i> - <i>Cladosporium herbarum</i> - <i>Penicillium</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i>
		VIRUS Y BACTERIAS	- Rinovirus - Otros virus respiratorios
FACTORES LABORALES	SUSTANCIAS DE BAJA MASA MOLECULAR	INDUSTRIA IMPLICADA	
	- Fármacos - Anhídridos - Diisocianatos - Maderas - Metales - Otros	- Industria farmacéutica - Industria del plástico - Industrias de poliuretano, plástico, barnices y esmaltes - Aserraderos, carpinterías, ebanisterías - Fundiciones, industrias de niquelados, plateados, curtidos de piel, limpieza de calderas - Industrias de cosméticos, peluquerías, revelado de fotografía, refrigeración, tintes	
	SUSTANCIAS DE ALTA MASA MOLECULAR	INDUSTRIA IMPLICADA	
	- Sustancias de origen vegetal, polvo y harinas - Alimentos - Enzimas vegetales - Gomas vegetales - Hongos y esporas - Enzimas animales	- Granjeros, trabajadores portuarios, molinos, panaderías, industria cervecera, procesamiento de soja, industrias del cacao, café y té, industria textil - Industria alimentaria - Industria alimentaria, industria farmacéutica - Industria alimentaria, imprentas, industria del látex, sanitarios - Panaderías, granjas, agricultores - Molinos, fabricación de carmín	
FACTORES SISTÉMICOS	FÁRMACOS	- Antibióticos sensibilizantes - Ácido acetil salicílico	- β-bloqueantes no selectivos sistémicos y tópicos - AINE
	ALIMENTOS	- Leche de vaca - Huevo - Frutos secos	- Cereales - Pescados - Mariscos
		- Alimentos con sulfitos	Frutos secos, vino, zumos de limón, lima y uva, patatas desecadas, vinagre, marisco, cerveza, etc.
		- Panalérgenos vegetales como profilinas o proteína de transferencia de lípidos (LTP)	
	OTROS	- Veneno de himenópteros	<i>Apis mellifera</i> (abeja), <i>Vespula spp</i> (avispa), <i>Polistes dominulus</i> (avispa)

SO₂: dióxido de azufre; NO₂: dióxido de nitrógeno; CO: monóxido de carbono; AINE: antiinflamatorios no esteroideos (Comité Ejecutivo de GEMA, 2017).

Diversos agentes desencadenantes de los síntomas del asma pueden producir, por diferentes mecanismos, estrechamiento intenso de la vía respiratoria, produciendo la exacerbación del asma. Las crisis más graves ocurren generalmente por infecciones víricas de la vía respiratoria superior (fundamentalmente por rinovirus y virus respiratorio sincitial) o por exposición alérgica (Jackson y Johnston, 2010). También pueden producir exacerbaciones asmáticas los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), el ejercicio, el aire frío o ciertos irritantes inespecíficos. La gravedad e intensidad de la respuesta a estos desencadenantes depende de la inflamación presente de base.

2.2. Patogenia

Aunque hay un gran espectro clínico del asma, la presencia de inflamación de las vías respiratorias es una característica patológica común. La inflamación está presente incluso cuando los síntomas son episódicos y además, afecta a todas las vías respiratorias. Sin embargo, no está clara la relación entre la gravedad del asma y el grado de inflamación (Levine y Wenzel, 2010). El asma se origina por interacciones complejas entre factores génicos y agentes medioambientales como son los aeroalérgenos y virus respiratorios. En la mayoría de los pacientes asmáticos, el patrón inflamatorio característico incluye un aumento del número de mastocitos, eosinófilos activados, células *natural killer* (NK), linfocitos Th2 y neutrófilos, que liberan mediadores que ocasionan los síntomas de la enfermedad (Barnes, 2011; Al-Muhsen, Johnson y Hamid, 2011). La respuesta inflamatoria más asociada con el asma es la relacionada con el asma alérgica, cuyos protagonistas son las células Th2 y los eosinófilos (de ahí el nombre de asma Th2 o eosinofílica). En particular (Figura 2), dentro del lumen de las vías respiratorias los alérgenos son atrapados por células dendríticas, que los procesan y los convierten en moléculas antigénicas que presentan a células Th0. La activación de células Th2 específicas de alérgeno es la responsable de la producción de IL-4 e IL-13, que promueve la producción de anticuerpos IgE por los linfocitos B. Además, las células Th2 liberan IL-5 que induce la maduración y supervivencia de los eosinófilos. Estos acontecimientos se ven favorecidos por un defecto funcional de la producción por las células Treg de IL-10 y TGF- β (factor de crecimiento transformador β), que normalmente ejercen una acción inmunosupresora sobre las respuestas mediadas por células Th2. Sumándose a la acción de las células Th2, las células Th9, que liberan IL-9, también pueden ser activadas, provocando la proliferación de mastocitos, que al desgranularse por la unión de anticuerpo IgE, liberan mediadores como histamina, cys-LT, prostaglandinas y citocinas.

Además del asma alérgica, existen otras respuestas inflamatorias que implican otros mecanismos y células distintas a las Th2 y los eosinófilos, que están tomando relevancia últimamente y cuya

implicación a nivel clínico está aún por definirse. Otros linfocitos T importantes para la patología del asma son las células Th17, que producen IL-17A e IL-17F que ocasionan el reclutamiento y la expansión de neutrófilos (asma neutrofílica). Así mismo, favoreciendo la acción de las Th17, las células Th1, dependientes de IL-12 y liberadoras de IFN- γ , se pueden activar sobre todo como consecuencia de una infección de las vías respiratorias por un virus respiratorio. Se puede dar también el hecho de que la respuesta inflamatoria esté mediada por una mezcla de eosinófilos y neutrófilos pasándose a denominar paucigranulocítica.

Por último, muchos mediadores, citocinas y factores de crecimiento producidos por las diversas células implicadas en la inflamación crónica de las vías respiratorias pueden afectar a las funciones y los ritmos de proliferación de elementos celulares estructurales de las vías respiratorias (Figura 2) (Pelaia *et al.*, 2015). Las células estructurales de las vías respiratorias (epitelio bronquial, musculatura lisa bronquial, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos y nervios colinérgicos) también producen mediadores inflamatorios que facilitan la permanencia de la inflamación por varios mecanismos: liberación de proteínas pro-inflamatorias, hiperplasia, hipertrofia, reclutamiento de células inflamatoria, remodelación de la vía respiratoria, broncoconstricción y secreción de moco. Las interacciones celulares que hacen posible este proceso inflamatorio se realizan a través de mediadores celulares y moléculas con funciones muy variadas como quimiocinas, **cys-LT**, citocinas, histamina, óxido nítrico y PGD2.

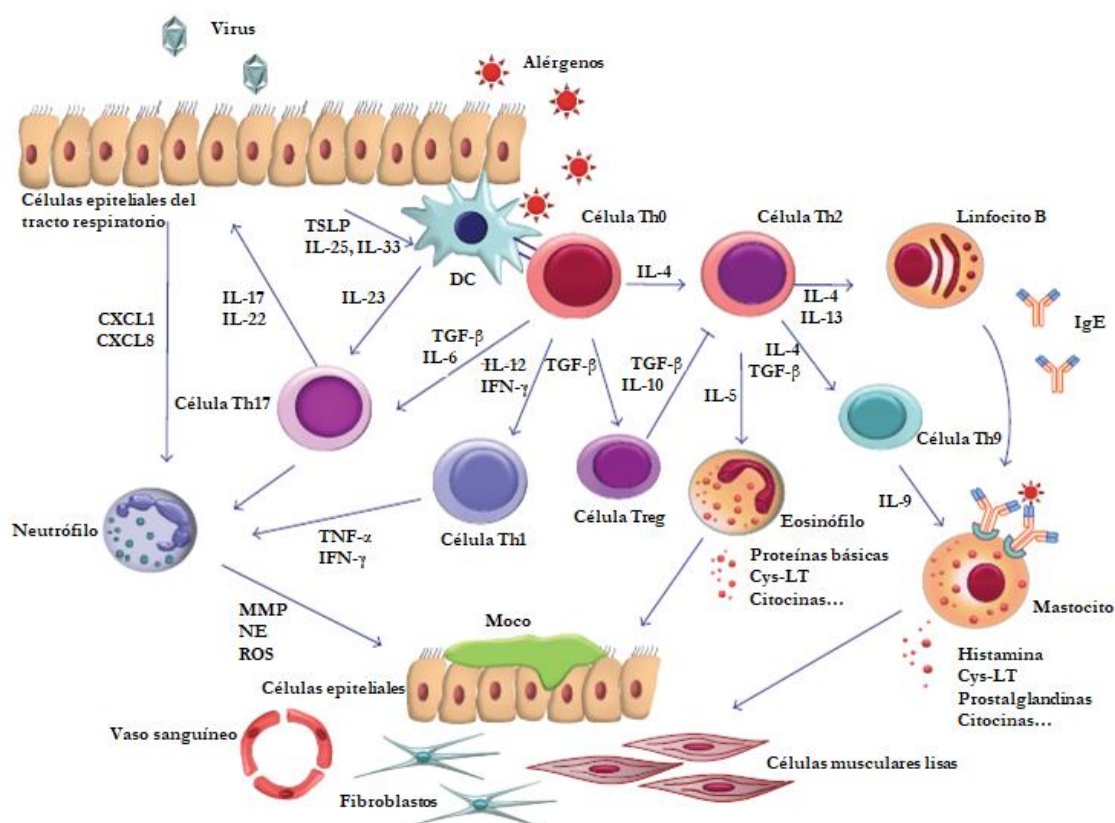


Figura 2: Patogénesis de la inflamación de las vías respiratorias en el asma. La activación y proliferación de células Th2 y células Th17 por agentes externos como virus y alérgenos da lugar a la activación de eosinófilos (asma eosinofílica) y mastocitos, y neutrófilos (asma neutrofílica), respectivamente, que producen muchos mediadores, citocinas y factores de crecimiento que afectan al funcionamiento y a la proliferación de células estructurales de las vías respiratorias como células endoteliales de los vasos sanguíneos, células epiteliales, fibroblastos y células musculares lisas. Esto provoca los síntomas característicos del asma. MMP: metaloproteinasas de la matriz; NE: endopeptidasa neutrofílica; ROS: especie reactiva del oxígeno. (Figura adaptada de Pelaia *et al.*, 2015).

Además de la respuesta inflamatoria, los pacientes asmáticos presentan cambios estructurales característicos, conocidos como remodelación de las vías respiratorias, que incluyen: engrosamiento de la capa reticular de la membrana basal, fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial, proliferación y dilatación de los vasos, hiperplasia de las glándulas mucosas e hipersecreción de moco. Todo esto origina una progresiva pérdida de la función pulmonar (Al-Muhsen, Johnson y Hamid, 2011). Algunos de estos fenómenos se relacionan con la gravedad de la enfermedad y pueden conducir a una obstrucción bronquial, en ocasiones, irreversible (Al-Muhsen, Johnson y Hamid, 2011). El remodelado de las vías respiratorias puede ser consecuencia de una respuesta reparadora a la inflamación crónica o puede aparecer independientemente del proceso inflamatorio (Grainge *et al.*, 2011).

La hiperreactividad bronquial (HRB) o excesivo estrechamiento de las vías respiratorias en respuesta a estímulos que son inocuos en personas sin asma, es otra característica de la fisiopatología del asma. Conduce a una limitación variable al flujo aéreo y a la aparición de

síntomas intermitentes y se vincula con la inflamación y la reparación de las vías respiratorias. Se han descrito diversos mecanismos en la aparición de la HRB (Comité Ejecutivo de GEMA, 2017; Al-Muhsen, Johnson y Hamid, 2011; Shrewsbury, Pyke y Britton, 2000). El grado de HRB se correlaciona parcialmente con la gravedad clínica del asma y con marcadores de la inflamación (O'Byrne e Inman, 2003). El tratamiento antiinflamatorio ayuda al control del asma y reduce la HRB, pero esta mejora es parcial (West *et al.*, 2013).

La obstrucción bronquial es la consecuencia común a la que conducen los cambios fisiopatológicos del asma y el origen de la mayoría de los síntomas. Sin embargo, la limitación al flujo aéreo y los síntomas que desencadena pueden desaparecer espontáneamente o paliarse con medicación, e incluso encontrarse ausentes durante un tiempo.

La variabilidad, otra característica del asma, se define como la variación o fluctuación de los síntomas y de la función pulmonar en el tiempo, incluso en un mismo día, y que puede determinarse con la medida diaria del flujo espiratorio máximo (FEM), es decir, la velocidad máxima con la que una persona puede espirar.

2.3. Síntomas y diagnóstico

Para el diagnóstico del asma se deben considerar los síntomas y signos clínicos más comunes como son las sibilancias (el más característico) (Holleman y Simel, 1995), la disnea (o dificultad respiratoria), la tos y la opresión torácica. Estos son habitualmente variables, de predominio nocturno o de madrugada, y provocados por diferentes desencadenantes ya comentados. Las variaciones estacionales, el inicio de los síntomas, la presencia de rinitis alérgica o eczema y los antecedentes familiares de asma o atopia son aspectos importantes a tener en cuenta (*British Thoracic Society* y *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*, 2012; Buke *et al.*, 2003). Ninguno de estos síntomas y signos son específicos de asma (Bel, 2004), de ahí la necesidad de realizar pruebas funcionales respiratorias. En la exploración física, lo más característico son las sibilancias en la auscultación y en ocasiones, obstrucción nasal en la rinoscopia anterior y dermatitis o eczema. Sin embargo, una exploración física normal no descarta el diagnóstico de asma. Ante la sospecha de asma, se debe realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades, en particular con EPOC. Un punto importante a considerar del asma son las exacerbaciones (agudizaciones, ataques o crisis). Estas son episodios de empeoramiento de la situación basal del paciente que requieren modificaciones en el tratamiento. Deben identificarse clínicamente por cambios en los síntomas, en la medicación o en la función pulmonar, respecto a la variación diaria del paciente (Reddel *et al.*, 2009).

El diagnóstico de asma se establece cuando en un paciente con síntomas de sospecha, y mediante una prueba de función pulmonar, se demuestra de forma objetiva una alteración correspondiente a esta enfermedad. Las principales alteraciones funcionales del asma, como ya se ha comentado, son la obstrucción del flujo aéreo, su reversibilidad (o recuperación del flujo tras la administración de un tratamiento), la variabilidad y la HRB.

La espirometría es la prueba diagnóstica de primera elección en toda consulta de Alergología y Neumología. Los principales parámetros que mide son la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁). Los valores de referencia se deben adaptar a la edad y etnia/raza de cada paciente. La obstrucción se define como un cociente FEV₁/FVC por debajo del límite inferior de los valores de referencia, que arbitrariamente se sitúa en 0,7. Pero este criterio puede sobreestimar la obstrucción en personas de edad avanzada (Pellegrino *et al.*, 2005). Un FEV₁ reducido confirma la obstrucción, ayuda a establecer su gravedad e indica un mayor riesgo de exacerbaciones (Kitch *et al.*, 2004). También puede ocurrir en muchos enfermos con asma que muestren una espirometría con valores normales o incluso un patrón no obstructivo.

La reversibilidad puede ser identificada por una mejoría del FEV₁ o FEM tras 2 semanas de tratamiento con glucocorticoides sistémicos (40 mg/día de prednisona o equivalente) o 2-8 semanas de glucocorticoides inhalados (1.500-2.000 mg/día de fluticasona o equivalente) (Phillips *et al.*, 2004). Hay que tener en cuenta que la reversibilidad de la obstrucción bronquial no está presente en todos los pacientes.

La variabilidad es un parámetro esencial para el diagnóstico y control del asma. El índice de variabilidad diaria más común es la amplitud del FEM con respecto a la media registrada durante un mínimo de 1-2 semanas, antes de la medicación (Reddel *et al.*, 1995). Una variabilidad del FEM mayor del 20 % resulta diagnóstica de asma (Boezen *et al.*, 1994).

La identificación de la HRB puede ser clave en pacientes con sospecha clínica de asma, pero que muestran una función pulmonar normal. Para esto se estudia la respuesta excesiva a un broncoconstrictor empleando agentes directos, como la metacolina o la histamina, o indirectos, como adenosina monofosfato, manitol o solución salina hipertónica (Cockcroft, 2003).

La fracción exhalada de óxido nítrico (FE_{NO}) mide de forma no invasiva la inflamación provocada por eosinófilos en las vías respiratorias. El procedimiento de determinación ha sido estandarizado (*American Thoracic Society y European Respiratory Society*, 2005) y el punto de corte se ha establecido en 50 partículas por billón en adultos (Dweik *et al.*, 2011; Karrasch *et al.*, 2017). Sin

embargo, no hay que dar por sentado que un valor normal de FE_{NO} excluye el diagnóstico de asma, especialmente en personas no alérgicas (Taylor *et al.*, 2006).

2.4. Clasificación

Con todas las características descritas anteriormente de la enfermedad asmática, se puede deducir que uno de los principales problemas para definir esta patología es su amplio espectro clínico, ya que puede oscilar desde un episodio ocasional (fácilmente revertido) hasta un bloqueo mantenido que requiere altas dosis de tratamiento. Además, un amplio porcentaje de los pacientes no llega a controlar su enfermedad (Price, Fletcher, y van der Molen, 2014), por lo que otro aspecto importante de esta enfermedad es la diferencia de respuesta frente al tratamiento en los pacientes asmáticos. La heterogeneidad en las causas y manifestaciones del asma hace que se considere como un síndrome o un conjunto de enfermedades y no como una única enfermedad. Desde las primeras décadas del siglo XX, los médicos clasifican el asma atendiendo a su posible etiología (alérgica, intrínseca o no alérgica, de origen laboral) o a su intensidad o gravedad (leve, moderada, grave, mortal) (Zubeldia *et al.*, 2012). En general, en la comunidad médica se acepta que las diferencias clínicas observadas en la respuesta frente al tratamiento o en el curso de la enfermedad a lo largo del tiempo están relacionadas con múltiples variaciones subyacentes en mecanismos genéticos, farmacológicos, fisiológicos, biológicos y/o inmunológicos que podrían definir subtipos de fenotipos denominados endotipos (Collins y Varmus, 2015; Fajt y Wenzel, 2015; George *et al.*, 2015; Wenzel, 2012; Anderson, 2008). Estas variaciones modifican el curso del proceso inflamatorio de las vías respiratorias y los procesos de remodelado, además de influir en su futuro tratamiento. Esta heterogeneidad ha conducido al llamamiento de la búsqueda de la medicina de precisión o personalizada (entre otros) para encontrar otros enfoques diagnósticos y terapéuticos. Un endotipo puede consistir en varios mecanismos que no son fácilmente distinguibles. Su descripción puede depender de biomarcadores moleculares, que pueden ser la firma de una vía compleja o una molécula clave asociada con, o que directamente juega un papel principal en ese endotipo concreto de la enfermedad (Agache *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista clínico actual, el asma es una enfermedad muy heterogénea, con un gran número de fenotipos diferentes. Aunque el asma alérgica afecta a una importante proporción de pacientes, del 10 % al 33 % de sujetos con asma, son sujetos no alérgicos, definidos como sujetos con asma pero sin ninguna sensibilización alérgica asociada (Peters, 2014). Sin embargo, la atopía y mecanismos alérgicos se están implicando en un 50-80 % de los pacientes asmáticos y aproximadamente en un 50 % de los pacientes con asma grave (D'Amato *et al.*, 2014; Holgate, 2012). Esta es una de las razones por las que el asma se ha asociado habitualmente con la

inflamación respiratoria de tipo 2 (o mediada por células Th2), caracterizada por elevados niveles de IgE, eosinófilos y algunas citocinas como la IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9. Sin embargo, en la actualidad, hay una tendencia a clasificar el asma según la valoración de diferentes características, como la expresión clínica, el tipo de inflamación, la edad de comienzo, la respuesta a la terapia, etc. Esto es lo que se llama fenotipo, aunque según ciertos autores estrictamente este término no se debería utilizar, ya que implica relacionar ciertas características clínicas con marcadores genéticos y ambientales, hecho que todavía no se realiza (Zubeldia *et al.*, 2012). Gran cantidad de estudios han caracterizado diversos fenotipos de la enfermedad asmática en grupos de pacientes de características demográficas, clínicas o fisiopatológicas determinadas (Bel, 2004; Wenzel, 2012; Moore *et al.*, 2010; Anderson, 2008). Aun así, y por el momento, no existen pruebas fehacientes para recomendar una clasificación de la enfermedad basada en fenotipos del asma, ni una categorización por el control con el tratamiento habitual. Actualmente se admite que los fenotipos de asma se agrupan en tres grandes bloques (no excluyentes entre sí: clínicos o fisiológicos, relacionados con desencadenantes, e inflamatorios (Tabla 2) (Comité Ejecutivo de GEMA, 2017). Se asume que puede haber solapamiento entre las distintas categorías, y un paciente puede pasar de un fenotipo a otro (Zubeldia *et al.*, 2012).

Tabla 2: Fenotipos asmáticos

Clínicos o fisiológicos	Asma grave.
	Asma con exacerbaciones graves.
	Asma refractaria al tratamiento, sobre todo en pacientes sin alergia y asma corticodependiente.
	Asma de inicio precoz, en menores de 12 años, que suele ser alérgica.
	Asma de inicio tardío, sobre todo mujeres, se inicia en la edad adulta y suelen cursar sin alergia.
	Asma con limitación fija al flujo aéreo, por remodelación bronquial; por síndrome de solapamiento asma y EPOC.
	Asma y obesidad, con síntomas graves.
Relacionados con desencadenantes	Asma alérgica, por alérgenos ambientales u ocupacionales.
	Asma inducida por AINE.
	Asma inducida por menstruación.
	Asma inducida por ejercicio.
Inflamatorios	Asma eosinofílica, suele ser alérgica y tener buena respuesta a glucocorticoides inhalados, en general.
	Asma neutrofílica, suele darse en pacientes con enfermedad grave y exacerbaciones graves, con peor respuesta a glucocorticoides inhalados.
	Asma paucigranulocítica.

(Comité Ejecutivo de GEMA, 2017).

2.4.1. Gravedad clínica

El asma se ha clasificado habitualmente en función de la gravedad, aunque la definición ha ido evolucionando con el tiempo (Plaza Moral y Comité Ejecutivo de GEMA, 2009; GINA, 2018; U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health y National Heart, Lung and Blood Institute, 2007). La gravedad del asma es una propiedad intrínseca de la enfermedad, que refleja la intensidad de las anomalías fisiopatológicas e implica tanto la intensidad del proceso, como la respuesta al tratamiento (Bateman *et al.*, 2006; Stoloff y Boushey, 2006). La gravedad habitualmente se evalúa cuando el paciente está siendo tratado y se clasifica en función de las necesidades de tratamiento de mantenimiento que se requieren para alcanzar el control de los síntomas y las exacerbaciones (Taylor *et al.*, 2008). Tradicionalmente se divide en cuatro categorías: intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave (Tabla 3) (Plaza Moral y Comité Ejecutivo de GEMA, 2009).

Tabla 3: Clasificación del asma en función de la gravedad

	Intermitente	Persistente Leve	Persistente moderada	Persistente grave
Síntomas diurnos	No (2 veces o menos a la semana)	Más de 2 veces a la semana	Síntomas a diario	Síntomas continuos (varias veces al día)
Medicación de alivio (agonista β_2-adrenérgico de acción corta)	No (2 veces o menos / semana)	Más de 2 veces a la semana pero no diario	Todos los días	Varias veces al día
Síntomas nocturnos	No más de 2 veces al mes	Más de 2 veces al mes	Más de una vez a la semana	Frecuentes
Limitación de la actividad	Ninguna	Algo	Bastante	Mucho
Función pulmonar (FEV₁ o FEM) % teórico	> 80%	< 80%	> 60% - < 80%	< 60%
Exacerbaciones	Ninguna	Una o ninguna al año	Dos o más al año	Dos o más al año

(Plaza Moral y Comité Ejecutivo de GEMA, 2009).

La gravedad no es una característica del asma necesariamente constante, sino que puede variar a lo largo del tiempo (en meses o años), por lo que es necesario reevaluarla periódicamente. La gravedad se determina de forma retrospectiva en el paciente cuyo asma está controlada según el escalón terapéutico en que se encuentre, es decir, basándose en la cantidad de medicación que es necesaria para mantener el control de la enfermedad (Taylor *et al.*, 2008; Cockcroft y Swystun, 1996), recurriéndose a la reducción del escalón si ello fuera necesario para estipular las cantidades

mínimas de tratamiento (GINA, 2018). Se puede establecer la clasificación en un paciente que no esté recibiendo tratamiento de mantenimiento, pero esto es infrecuente.

2.5. Tratamiento

Probablemente debido a la gran complejidad y heterogeneidad que presenta el asma, hasta el momento, no hay ninguna cura para esta enfermedad. Los tratamientos actualmente disponibles intentan mantener el control de la enfermedad, procurando hacerlo lo más rápido posible, para prevenir las exacerbaciones y la obstrucción crónica al flujo aéreo, e intentar reducir al máximo su mortalidad. Hay que destacar, que en un alto porcentaje de pacientes con un tratamiento adecuado, se consigue controlar tanto los síntomas diarios como el número de exacerbaciones y una pérdida exagerada de la función pulmonar y por tanto, el riesgo futuro. Sin embargo, siempre hay un porcentaje de pacientes que no responde de forma adecuada a ningún tratamiento (GEMA, 2015), razón por la que existe una necesidad real de concretar en la definición de este tipo de enfermedades respiratorias, para mejorar el diagnóstico y tratamiento de estas patologías tan prevalentes.

Los fármacos actuales para tratar el asma se clasifican como de control o mantenimiento, y de alivio o rescate según sus diferencias en dosificación. Los medicamentos de control o mantenimiento, que deben administrarse a diario durante periodos prolongados, incluyen glucocorticoides inhalados (GCI), antagonistas de los receptores para leucotrienos (ARLT), agonistas β_2 adrenérgicos de acción larga (LABA por sus siglas en inglés: *long acting β_2 agonists*), tiotropio y anticuerpos monoclonales (mAb) anti-IgE (omalizumab). Los GCI operan en su acción antiinflamatoria uniéndose al receptor para glucocorticoides que activa genes que codifican proteínas antiinflamatorias. Los GCI utilizados son beclometasona, budesónida, fluticasona, mometasona y ciclosenida (Comité Ejecutivo de GEMA, 2015). Los ARLT, montelukast o zafirlukast, interfieren competitivamente en la unión al receptor para leucotrienos CysLT1 y esta unión, produce un efecto antiinflamatorio. Los LABA, con acción broncodilatadora larga de 12h a 24h, estimulan de forma prolongada los receptores beta de la vía respiratoria provocando relajación del músculo liso, además de bloquear la broncoconstricción inducida por otros estímulos. Los fármacos LABA utilizados son salmeterol, formoterol, y vilanterol. El tiotropio es un broncodilatador anticolinérgico de acción larga (24h), específico de los receptores muscarínicos que actúa inhibiendo la broncoconstricción y la secreción glandular de mucosa. El omalizumab es un tratamiento dirigido por mAB que se unen a IgE y bloquean la interacción entre esta inmunoglobulina y las células efectoras de la respuesta asmática (Carrasco, 2013; Comité Ejecutivo de GEMA, 2015).

Los medicamentos de alivio o rescate se utilizan a demanda, para tratar o prevenir la broncoconstricción de forma rápida y, entre ellos, se encuentran los agonistas β_2 -adrenérgicos de acción corta (o SABA por sus siglas en inglés: *short acting β_2 agonists*) inhalados, que son broncodilatadores con acción rápida y limitada a 4h. Ejemplos de SABA son el salbutamol, la terbutalina y el fenoterol. Otro medicamento de rescate son los anticolinérgicos inhalados como el bromuro de ipratropio. El ipratropio es un broncodilatador cuyo mecanismo de acción es similar al del tiotropio pero es más rápido y de duración más corta, pudiéndose utilizar hasta 4 veces al día (Carrasco, 2013; Comité Ejecutivo de GEMA, 2015).

El asma grave se caracteriza por la necesidad de precisar múltiples fármacos y a altas dosis para su tratamiento (Taylor *et al.*, 2008). Se asocia a un mayor consumo de recursos económicos en comparación con el asma moderada o leve (Serra-Batlles *et al.*, 1998; Martínez-Moragón *et al.*, 2009). Así pues, el asma grave no controlada se define como la enfermedad asmática que persiste mal controlada pese a recibir tratamiento con una combinación de GCI/LABA, a dosis elevadas en el último año, o bien glucocorticoides orales durante al menos seis meses del mismo periodo (Chung *et al.*, 2014).

3. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica no es uno de los objetivos centrales de esta Tesis, pero dada su relación con las enfermedades abordadas, sobre todo con el asma, y puesto que se ha utilizado como enfermedad respiratoria control en uno de los estudios abordados en esta Tesis, a continuación se da una breve explicación sobre la misma.

3.1. Definición

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una enfermedad frecuente, prevenible y tratable, que se caracteriza por la presencia de síntomas respiratorios persistentes y limitación del flujo aéreo a causa de alteraciones de las vías respiratorias o de los alvéolos usualmente producidas por una exposición significativa a partículas o gases nocivos. La EPOC se caracteriza por una limitación crónica del flujo aéreo resultado de un estrechamiento en las vías respiratorias pequeñas (bronquiolitis obstructiva) y de la destrucción del parénquima pulmonar (enfisema), cuya relevancia varía según individuos. El daño en las vías respiratorias pequeñas da lugar a la limitación del flujo aéreo y a la disfunción mucociliar, muy característico de esta enfermedad (Vogelmeier *et al.*, 2017).

3.2. Factores de riesgo

Aunque el tabaquismo es el factor de riesgo más investigado de la EPOC, los estudios epidemiológicos han demostrado que las personas no fumadoras también pueden padecer esta enfermedad (Lamprecht *et al.*, 2011). Factores que pueden afectar a un individuo durante la gestación, el parto y las exposiciones durante la infancia y la adolescencia pueden limitar el desarrollo y crecimiento normal de los pulmones (Barker *et al.*, 1991; Todisco *et al.*, 1993). Además, existen aspectos dependientes del huésped (anomalías genéticas, desarrollo pulmonar anómalo y envejecimiento acelerado) que pueden predisponer a padecer EPOC.

Los individuos fumadores de cigarrillos tienen mayor prevalencia de síntomas respiratorios y de anomalías de la función pulmonar que los no fumadores, y sus tasas anuales de deterioro del FEV₁ y de mortalidad por EPOC son más elevadas (Kohansal *et al.*, 2009). Otras exposiciones que pueden suponer factores de riesgo en el desarrollo de la EPOC son las partículas generadas en el ámbito profesional (polvo orgánico e inorgánico, productos químicos y humos) (Paulin *et al.*, 2015; Eisner *et al.*, 2010), los gases de materiales que se queman habitualmente al aire libre o en estufas que pueden contaminar el aire interior (la madera, el estiércol animal, los residuos agrícolas y el carbón) (Orozco-Levi *et al.*, 2006), y la contaminación doméstica por biomasa, utilizada para cocinar y calentar viviendas mal ventiladas (Gan *et al.*, 2013; Ezzati, 2005; Zhou *et al.*, 2014).

El asma representa un riesgo para el desarrollo de la limitación crónica del flujo aéreo y EPOC (Silva *et al.*, 2004). Los antecedentes de infección respiratoria grave en la infancia se han asociado con una menor función pulmonar y con un aumento de los síntomas respiratorios en la edad adulta (de Marco *et al.*, 2011). Por su parte, la tuberculosis también se ha identificado como factor de riesgo de EPOC y una co-morbilidad potencial (Menezes *et al.*, 2007; Jordan, Spencer y Davies, 2010; Byrne *et al.*, 2015).

3.3. Patogenia

La inflamación en EPOC se localiza principalmente en las vías respiratorias periféricas y en el parénquima pulmonar (Barnes, 2016) y se asocia con una inflamación sistémica (Barnes, 2014). A diferencia del asma, las causas principales de la obstrucción de las vías respiratorias es el estrechamiento de vías respiratorias pequeñas debido a la fibrosis y al colapso de las vías periféricas, causado por la pérdida de elasticidad del parénquima pulmonar, que da lugar al atrapamiento del aire. Todos estos mecanismos son irreversibles. Sin embargo, hay una contracción colinérgica de las vías respiratorias pequeñas (tono colinérgico), que es reversible. La

hipersecreción de moco también puede contribuir a la obstrucción de las vías respiratorias, ya que el moco ocupa el lumen de la vía y tiende a quedarse retenido por la disfunción ciliar. La obstrucción de las vías respiratorias en EPOC normalmente es progresiva, con una disminución acelerada de la función pulmonar a lo largo de los años. En EPOC, hay un aumento de neutrófilos y macrófagos en el lumen de las vías respiratorias y un mayor número de macrófagos, linfocitos T y linfocitos B en la pared de las vías y del parénquima (Barnes, 2008; Brusselle, Joos y Bracke, 2011; Hogg *et al.*, 2004). La respuesta inflamatoria en EPOC incluye respuestas inmunes innatas y adaptativas conectadas por la activación de células dendríticas (Givi *et al.*, 2012). Así pues, irritantes inhalados como el humo de cigarrillos o de la combustión de biomásas activan a las células epiteliales y a macrófagos que liberan diversos factores quimiotácticos que atraen a las células inflamatorias a los pulmones. Factores como CCL2, que actúa sobre CCR2 para atraer monocitos, CXCL1 y CXCL8, que actúan sobre el receptor 2 para quimiocinas CXC o CXCR2 para atraer neutrófilos y monocitos (que se diferencian en macrófagos en los pulmones) y CXCL9, CXCL10 y CXCL11, que actúan sobre CXCR3 para atraer a células Th1 y células Th1 citotóxicas CD8⁺ (Tc1) o linfocitos T que liberan perforina causando la destrucción de la pared alveolar (enfisema). Por otro lado, los macrófagos también liberan IL-23, que actúa sobre células Th17 que liberan IL-17, promoviendo la inflamación neutrofílica. Los neutrófilos, junto con los macrófagos y las células epiteliales, liberan proteasas, como la MMP9, que provocan la degradación de la elastina y enfisema. La elastasa de neutrófilos (liberada por los neutrófilos) causa la hipersecreción de moco. Las células epiteliales y los macrófagos liberan también TGF- β , que estimula la proliferación de fibroblastos y la liberación del factor de crecimiento de tejido conectivo, que produce la fibrosis alrededor de las vías respiratorias pequeñas (Barnes, 2017).

Tanto asma como EPOC se caracterizan por una inflamación en los pulmones, pero la naturaleza de esta inflamación es diferente entre estas enfermedades, además de existir una gran variabilidad dentro de cada enfermedad, lo que da lugar a un amplio espectro de fenotipos clínicos. Asma y EPOC generalmente poseen características diferenciales claras, con implicación de diferentes tipos celulares y mediadores inflamatorios, además de una respuesta diferente al tratamiento con corticosteroides. Sin embargo, algunos pacientes comparten características del asma y EPOC y el solapamiento asma-EPOC (ACO, del inglés *asthma-COPD overlap*) es importante reconocerlo clínicamente para la correcta elección de la terapia: aproximadamente el 15 % de los pacientes con EPOC tienen características del asma, y a su vez, una proporción similar de pacientes con asma tienen rasgos de EPOC (Barnes, 2017).

3.4. Síntomas y diagnóstico

Debe considerarse el diagnóstico de EPOC en todo paciente que presente disnea, tos crónica o expectoración y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad (Vogelmeier *et al.*, 2107). La disnea crónica y progresiva es el síntoma más característico de la EPOC. La disnea es una causa fundamental de discapacidad y ansiedad en esta patología (Miravittles *et al.*, 2014). La tos crónica suele ser el primer síntoma y el paciente a menudo la considera como una consecuencia del tabaquismo o de exposiciones ambientales. La bronquitis crónica se define clásicamente como la expectoración regular ≥ 3 meses en 2 años consecutivos (*Medical Research Council Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis*, 1965), pero es una definición arbitraria. Otras características frecuentes que se dan en la enfermedad grave son la fatiga, la pérdida de peso y la anorexia (von Haehling y Anker, 2010; Schols *et al.*, 1993). Se debe tener en cuenta la posibilidad de una EPOC y practicar una espirometría forzada si están presentes algunos de estos síntomas en una persona mayor de 40 años. La EPOC puede cursar con agudizaciones de los síntomas respiratorios, denominadas exacerbaciones.

Es necesario realizar una espirometría para establecer el diagnóstico en este contexto clínico (Buist *et al.*, 2007). En ella, un cociente $FEV_1/FVC < 0,70$ tras la prueba broncodilatadora confirma la existencia de una limitación persistente del flujo aéreo e identifica la presencia de EPOC en pacientes con síntomas y riesgos compatibles con dicho diagnóstico.

Claramente, hay diferentes fenotipos clínicos de EPOC, con algunos pacientes teniendo principalmente alteraciones en las vías respiratorias pequeñas, mientras que otros tienen primordialmente un aumento del espacio alveolar y destrucción del parénquima (enfisema). Aunque ha habido intentos de segregar los pacientes con EPOC en diferentes grupos basándose en características clínicas y radiológicas, ha sido difícil identificar estos fenotipos en poblaciones diferentes y no ha habido una conexión con mecanismos subyacentes de la enfermedad (endotipos) (Castald *et al.*, 2014; Burgel *et al.*, 2010). Según la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD) (Vestbo *et al.*, 2013), la gravedad de la limitación del flujo aéreo se clasifica según puntos de corte específicos de espirometría, prueba que se realiza tras la administración de un broncodilatador inhalado de acción corta que sirve para minimizar la variabilidad.

4. NUEVAS TECNOLOGÍAS DE ANÁLISIS MASIVO PARA EL CONOCIMIENTO DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

La gran variabilidad en los fenotipos clínicos de la alergia y el asma muestra la complejidad de este tipo de enfermedades, reflejando la implicación de factores genéticos y ambientales, es decir, de su carácter multifactorial. De hecho, el objetivo de múltiples investigaciones se ha centrado en tratar de identificar factores de riesgo potenciales en el ambiente e identificar genes asociados a estas enfermedades. Se trata de enfermedades poligénicas complejas, en las que los genes, el ambiente y el momento de la exposición, podrían ser las claves. Los genes potencialmente relevantes para originar trastornos pueden no serlo por sí solos, es decir, pueden ser modulados dependiendo de la exposición ambiental a la que una población determinada esté sometida. Del mismo modo, las exposiciones ambientales potencialmente relevantes para el desarrollo de una sintomatología serán más o menos influyentes dependiendo del contexto genético. Por otro lado, el momento de la exposición también es muy importante, ya que el contexto inmunológico en un momento determinado está influenciado por las exposiciones ambientales a las que ha sido sometido de forma individual y, a su vez, su respuesta frente a estas exposiciones estará determinada genéticamente (Hersey, 2004).

Con toda esta complejidad, las nuevas técnicas de análisis masivo u *ómicas* han supuesto un importante avance para el conocimiento de diferentes aspectos de la enfermedad asmática y alérgica como el diagnóstico, seguimiento, monitorización frente a tratamientos, búsqueda de biomarcadores de riesgo o protección y desarrollo de nuevos medicamentos. Las técnicas *ómicas* son principalmente genómica, transcriptómica y proteómica (análisis masivo de polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNP) y de expresión génica y proteica). Estas técnicas se han unido a los resultados más relevantes obtenidos con aproximaciones genómicas clásicas así como epigenómica (o estudios epigenéticos a gran escala) en el conocimiento de los diferentes aspectos de estas enfermedades (Cárdaba, 2015).

Clásicamente, existen dos aproximaciones experimentales principales para la búsqueda de genes relacionados con las enfermedades alérgicas: el análisis de genes candidatos y el análisis del genoma completo (*Genome Wide Screen* o GWS) con el fin de localizar nuevos loci o genes relacionados con la enfermedad (Oder y Hoffjan, 2006; Risch y Merikangas, 1996; Carlson *et al.*, 2004; Vercelli, 2008; Holloway *et al.*, 2010). Los estudios de búsqueda de asociación masiva a lo largo del genoma (*Genome wide association studies* o GWAS) se han podido realizar en grandes poblaciones de pacientes. Los estudios con GWAS están basados en la habilidad de analizar rápidamente variantes génicas, principalmente SNP, con un alto grado de heterocigosidad, a lo

largo de todo el genoma, para determinar qué variantes están asociadas con susceptibilidad a la enfermedad (estudios caso-control) o cuáles están asociadas con gravedad o respuesta al tratamiento. Con esta tecnología, la posibilidad de localizar genes que subyacen en las enfermedades complejas ha mejorado radicalmente. Sin embargo, los resultados de GWAS son el primer paso.

El análisis de expresión génica en enfermedades alérgicas ha sufrido una revolución por el uso de tecnologías basadas en micromatrices o nanodispositivos, ya que posibilitan el análisis masivo de SNP de una forma muy rápida. Es la aproximación más popular para identificar genes asociados a enfermedad, complementaria a las anteriores, que tiene la ventaja de poder medir la transcripción simultánea de varios genes e incluso de todo el genoma (Rolph *et al.*, 2006). Los análisis con micromatrices de ADN han sido también utilizados para comparar en humanos, la expresión de genes diferenciales entre controles y casos, o entre pacientes antes y después del tratamiento, con el fin de encontrar nuevos genes y mecanismos de la enfermedad o para definir firmas moleculares que ayuden al diagnóstico, la clasificación de la enfermedad y/o la elección del tratamiento más apropiado. La característica distintiva de los análisis de expresión génica con micromatrices es la posibilidad de poder identificar grupos enteros de genes relacionados funcionalmente, en lugar de hacerlo de forma individual. Se han logrado avances de gran interés para las enfermedades alérgicas utilizando esta metodología. En primer lugar, se han hallado y verificado múltiples potenciales biomarcadores y/o dianas terapéuticas (aunque aún están siendo validados) (Hakonarson, Bjornsdottir y Halapi, 2005; Hansel *et al.*, 2008; Sääf *et al.*, 2008; Izuhara y Saito, 2006; Kuperman *et al.*, 2005; Aguerri, *et al.*, 2013). En segundo lugar, se ha posibilitado el encontrar firmas moleculares asociadas con subfenotipos clínicos. Y, por último, otro avance importante generado por las micromatrices es el de conseguir descubrir vías funcionales alteradas, por el análisis de grupos de genes que interactúan, siendo normalmente genes relacionados a nivel funcional. Los perfiles de expresión génica pueden ser usados para identificar redes reguladoras clave, para descubrir potenciales nuevos genes candidatos, y para definir fenotipos, que luego pueden servir como rasgos cuantitativos para estudios genéticos (Baye, Martín y Khurana, 2010).

Tanto los estudios clásicos de asociación genética, como los más recientes de todo el genoma, han identificado con éxito un número de genes candidatos con importancia biológica, pero solo han podido explicar una modesta proporción de la variación fenotípica. Los mecanismos epigenéticos pueden contribuir a explicar los orígenes ambientales de la enfermedad y su variabilidad fenotípica (DeVries y Vercelli, 2013; Wilfried *et al.*, 2013; Blumenthal, 2012). Los mecanismos epigenéticos pueden contribuir a explicar los orígenes ambientales de la enfermedad y su variabilidad fenotípica (Berger *et al.*, 2009). Ptashne (2007) definió la epigenética basándose

en tres criterios: cambio en la actividad de un gen que no implica una mutación, iniciada por una señal y heredable, por mitosis o meiosis, en ausencia de la señal que inició el cambio. Clásicamente, se han identificado varios mecanismos epigenéticos: la metilación del ADN, la modificación de las histonas y reestructuración de la cromatina, y los pequeños ARN no codificantes (de 21 a 26 nucleótidos). En esta Tesis estudiaremos la metilación del ADN o modificación del ADN, en la que un grupo metilo es transferido desde S-adenosil-metionina a una posición C-5 de citosina por una ADN-5 metil-transferasa. Ocurre, casi exclusivamente, en dinucleótidos CpG, teniendo un importante papel en la regulación de la expresión del gen. Normalmente, hipermetilación suele estar asociada a silenciamiento génico, mientras que hipometilación se asocia a un aumento de la expresión génica.

En general, estas marcas epigenéticas están distribuidas a lo largo del genoma y controlan la expresión de los genes de una forma dinámica, comparado con las secuencias de ADN, que son estables en el tiempo. Otra acepción del término mecanismos epigenéticos es el estudio de los mecanismos que alteran la densidad del estado de la cromatina y su accesibilidad para unirse a los factores de transcripción. Esto es porque determinan el empaquetamiento del ADN en distintos estados de la cromatina. El patrón combinado de accesibilidad o inaccesibilidad de la cromatina confiere patrones de expresión génica que son específicos de tipos celulares y son reproducidos durante la mitosis, confiriendo un único epigenoma a cada tipo celular. Los mecanismos epigenéticos son esenciales para la plasticidad de la respuesta celular provocada por la exposición ambiental y el adecuado momento de los procesos de desarrollo. En la medida en que los factores ambientales y genéticos son esenciales para la patogénesis de las enfermedades alérgicas, la epigenética probablemente contribuye a los orígenes de la enfermedad y en gran medida, a su variabilidad fenotípica. Al igual que en los estudios genéticos, se están utilizando dos tipos de enfoque: los estudios de epigenética mediante el análisis de mecanismos epigenéticos concretos en genes candidatos y el análisis a gran escala. Los estudios epigenéticos de poblaciones, para poder analizar las principales clases de marcas epigenéticas a gran escala, son cada vez más factibles, gracias al desarrollo de los métodos de análisis del genoma completo (Cárdaba, 2015). Finalmente, un valor añadido de los mecanismos epigenéticos es la posibilidad de ser revertidos, lo que les convierte en áreas fundamentales de estudio para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

El rápido avance en genética y bioinformática ha permitido el desarrollo de múltiples herramientas, así como un gran número de bases de datos génicos y genómicos unidos a datos relacionados con la salud. Esto evidencia la gran aportación de información que se está relacionando actualmente con las enfermedades respiratorias, pero a su vez, esto abre un campo

por investigar, ya que hay una necesidad real para la confirmación de la asociación de estos nuevos biomarcadores que se están encontrando con las enfermedades y sus endotipos.

5. MEDICINA DE PRECISIÓN Y BIOMARCADORES DE ASMA Y ALERGIA

Según la definición de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (*U.S. National Library of Medicine*), la medicina de precisión es un planteamiento emergente para el tratamiento y prevención de una enfermedad que incluye la variabilidad individual en los genes, el medio ambiente y el estilo de vida de cada persona. Con este planteamiento, habría una probabilidad alta de tratar “al paciente adecuado con el fármaco adecuado en el momento adecuado”, con medidas preventivas y terapias hechas a medida para cada individuo (Chung, 2013). El enfoque de la medicina de precisión tiene como objetivo encontrar parámetros predictivos para elegir con exactitud qué estrategia profiláctica o terapéutica sería la más apropiada para una enfermedad concreta en un grupo de pacientes específicos. Por lo tanto, la medicina de precisión es lo opuesto al enfoque de “*one-size-fits-all*” (“una talla encaja para todos”), en el que las decisiones clínicas y las estrategias terapéuticas se llevan a cabo sin considerar al individuo (Braido, Holgate y Canonica, 2012). La medicina de precisión implica que los individuos se clasifican en subpoblaciones que se diferencian por su susceptibilidad a una enfermedad en concreto. Para identificar subpoblaciones de pacientes o fenotipos (Wenzel, 2012), el planteamiento de la medicina de precisión se basa en los mecanismos subyacentes en las distintas formas de cada enfermedad, es decir, en los endotipos (Lötvall *et al.*, 2011) utilizando medidas asociadas que actúan como biomarcadores (Vijverberg *et al.*, 2013). De hecho, pacientes con asma grave deberían de ser fenotipados desde el punto de vista clínico, funcional, inflamatorio y molecular para así personalizar el planteamiento terapéutico. Los fenotipos describen características de los pacientes asmáticos pero no proporcionan información de las causas de la enfermedad. Por lo tanto, el término “endotipos” se propuso para indicar un subtipo de la condición definido por un mecanismo biológico específico (Lötvall *et al.*, 2011). Cada endotipo puede justificar un fenotipo o más, y viceversa. El estudio de estos mecanismos biológicos subyacentes o endotipos del asma ha dado la oportunidad a los investigadores de identificar dianas terapéuticas precisas (Stokes y Casale, 2016).

Entender las diferentes vías que llevan a la inflamación crónica de las vías respiratorias sería la clave para identificar dianas terapéuticas más allá de las que se disponen actualmente. Los biomarcadores son herramientas importantes que ayudan a los clínicos a estratificar a los pacientes y les asisten en la identificación de fenotipos y endotipos del asma (Diamant *et al.*, 2010). De hecho, hay una necesidad creciente en la utilización de biomarcadores en el ámbito

clínico para poder tomar decisiones, especialmente en pacientes que no responden bien a los tratamientos estándar. En el asma, los biomarcadores podrían tener rasgos diagnósticos, pronósticos y predictivos (Medrek, Parulekar y Hanania, 2017). Un biomarcador ideal debería estar presente en niveles estables en individuos sanos siendo su presencia diferente en pacientes con la enfermedad, mostrando así la patología existente y la necesidad de un tratamiento. Debería poder ser evaluado rápidamente y por métodos simples, con alta sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivos y negativos adecuados. Es más, su medición debería ser fácil, reproducible y barata. Hay diversos biomarcadores para el asma en investigación con un valor considerable para la práctica clínica (Hanania y Diamant, 2018). Como ya ha quedado descrito varias veces a lo largo de este apartado, desde un punto de vista clínico, el asma es una enfermedad muy heterogénea, con un gran número de fenotipos diferentes. A pesar de la heterogeneidad clínica del asma, una gran parte de los esfuerzos en la búsqueda de nuevos tratamientos para el asma, se han centrado en la vía de las citocinas Th2. Sin embargo, la respuesta inmune Th2 es un endotipo complejo, con varios sub-endotipos (Muraro *et al.*, 2016), tales como los endotipos definidos como IL-5-alto, IL-13-alto o IgE-alto (Agache *et al.*, 2015) que definen subgrupos de pacientes que tendrían beneficios mediante el uso de tratamientos con distintas dianas. Estudios recientes sobre los mecanismos inflamatorios del asma han destacado la importancia de otros elementos esenciales, como por ejemplo el epitelio de las vías respiratorias que, al ser activado en respuesta a estímulos externos como alérgenos, polución y agentes infecciosos, induce el reclutamiento y/o la activación de células innatas y adaptativas (células dendríticas, mastocitos y células linfoides innatas) (Licona-Limon *et al.*, 2013). Ambas respuestas inmunitarias, la innata y la adquirida, contribuyen a los endotipos de respuesta Th2. Además, las células inflamatorias Th1/Th17 y mecanismos no alérgicos, modulan aún más el perfil de la inflamación de tipo Th2 (Seys *et al.*, 2013; Lindén y Dahlén, 2014; Chambers *et al.*, 2015).

Debido a la heterogeneidad y complejidad del asma, se necesita un planteamiento distinto al actual en la práctica clínica para el manejo del asma que considere esta variedad de rasgos de la enfermedad. El uso de datos *ómicos* y de análisis de agrupamientos no supervisados, junto con el uso de características clínicas y datos fisiológicos e inflamatorios, proporcionará una mayor oportunidad al fenotipado del asma basado en los mecanismos que conducen al desarrollo de la enfermedad, dirigiéndonos a la definición de endotipos (Chung, 2018). Así pues, se han utilizado nuevas estrategias como los enfoques *ómicos*, analizando muestras procedentes de diferentes tejidos dianas de la enfermedad, para intentar descubrir y validar biomarcadores moleculares del asma. Nuevos tratamientos experimentales, conocidos como terapias biológicas, están en diversas etapas de desarrollo clínico para pacientes con inflamación, dirigida por una respuesta inmune de tipo Th2: anticuerpos anti-IL-4/IL-13, anti-IL-4, anti-IL-5 y anti-IgE, así como antagonistas

CRTH2 (receptor para quimiocinas homólogo a una molécula expresada en los linfocitos Th2) y anticuerpos anti-IL-5R α (Boyman *et al.*, 2015; Radonjic-Hoesli *et al.*, 2015). Un resumen del estado de estas terapias biológicas en la actualidad se esquematiza en las Tablas 4 y 5. Sin embargo, los biomarcadores disponibles no son lo suficientemente específicos para seleccionar el subendotipo del asma de respuesta inmune de tipo Th2 que responde específicamente a un tratamiento dirigido. Esto puede deberse a varios factores, como la influencia genética (o epigenética), el desconocimiento de la vía inflamatoria inmunitaria predominante o la contribución en la respuesta del propio tejido remodelado. En resumen, aunque los recientes avances terapéuticos han desentrañado algunas de las contribuciones de distintos fenotipos y endotipos a la patogénesis del asma y la respuesta a terapias específicas, aún es necesaria más información para que se optimicen las respuestas al tratamiento, intentando evitar al mismo tiempo efectos adversos (Muraro *et al.*, 2016).

Tabla 4: Tratamientos del asma con enfoques dirigidos por biomarcadores

Biomarcador	Tratamiento con el que se espera producir una respuesta	Asociaciones clínicas	Comentarios (puntos a tener en cuenta, variabilidad/fluctuación)
Sangre			
Eosinófilos	Anti-IL-5	Exacerbaciones	Disponible fácilmente
	Anti-IgE	Reducción de la	Fluctuación significativa
	Anti-IL-4/IL-13	función pulmonar	
	Corticosteroides	Obstrucción fija	
	Antagonistas CRTH2	de las vías respiratorias	
IgE específica	Anti-IgE AIT	Exacerbaciones HRB (AIT)	
Periostina DPP4	Anti-IL-13	Disminución de la función pulmonar Exacerbaciones	En investigación Dependiente de ensayo
Espujo inducido			
Eosinófilos	Anti-IL-5	Exacerbaciones	En investigación
	ICS		Fluctuación significativa
IL-13	Anti-IL-13	Desconocida	En investigación
Aire exhalado			
FE_{NO}	Anti-IL-5	Exacerbaciones,	Disponible fácilmente
	Anti-IgE	disminución de la	Fluctuación significativa
	Anti-IL-13	función pulmonar	
	ICS		
Metabólica (VOC)	ICS	Desconocida	En investigación

Hay un solapamiento significativo entre los biomarcadores empleados para predecir la respuesta a diferentes estrategias dirigidas por el endotipo. Además, pocos biomarcadores están disponibles fácilmente, la mayoría fluctúan de forma significativa, y ninguno está aún validado ni su calidad garantizada. AIT: inmunoterapia con alérgeno; DPP4: dipeptidil-peptidasa 4; ICS: corticosteroides inhalados; VOC: componentes orgánicos volátiles (Muraro *et al.*, 2016).

Tabla 5: Tratamientos dirigidos por endotipos en asma de tipo Th2

Biomarcador predictivo	Medicamento	Diana	Efectos	Estado de regulación
Eosinófilos en sangre Periostina FE _{NO}	Omalizumab	IgE	Reduce las exacerbaciones Mejora los síntomas y la calidad de vida	Aprobado por FDA y EMA
Eosinófilos en sangre/esputo FE _{NO}	Mepolizumab	IL-5	Reduce el número de eosinófilos, exacerbaciones y OCS Mejora FEV ₁	Aprobado por FDA En evaluación por EMA Probado para CRSwNP
Eosinófilos en sangre	Reslizumab	IL-5	Reduce el número de eosinófilos, exacerbaciones Mejora FEV ₁	En evaluación por FDA
Eosinófilos en sangre	Benralizumab	IL-5R α	Reduce el número de eosinófilos y basófilos, exacerbaciones Mejora FEV ₁	Fase III
Eosinófilos en sangre	Dupilumab	IL-4R α	Reduce las exacerbaciones Mejora FEV ₁ Mejora los síntomas y la calidad de vida	Fase III Probado para CRSwNP, AD y EoE
Periostina DPP4	Tralokinumab	IL-13	Reduce el número de eosinófilos y exacerbaciones Mejora FEV ₁	Fase II
Periostina	Lebrikizumab	IL-13	Reduce las exacerbaciones Mejor FEV ₁	Fase III

Las vías de IgE, IL-5, e IL-4/IL-13 pueden ser abordadas con mAb. Hay un notable solapamiento entre los llamados biomarcadores predictivos y una heterogeneidad significativa en la respuesta clínica. FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; EMA: Agencia Europea del Medicamento; OCS: corticosteroides orales; CRSwNP: Rinosinusitis crónica con pólipos nasales; AD: dermatitis atópica; EoE: esofagitis eosinofílica; DPP4: dipeptidil-peptidasa 4; IL-4R α : receptor α para IL-4; IL-5R α : receptor α para IL-5 (Muraro *et al.*, 2016).

Por otro lado, como ya se ha detallado, entre el 10 % y el 33 % de los sujetos con asma, son sujetos con asma y sin ninguna alergia asociada (Peters, 2014). En estos sujetos, los mecanismos que contribuyen a la respuesta inmune son menos claros. En muchos casos, en lugar de inflamación eosinofílica, existe una prevalencia de neutrófilos (Peters M.C. *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2002; Bullens *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2013; Raedler *et al.*, 2015). El endotipo del asma de respuesta inmune no mediado por Th2 (o endotipo Th2-bajo) es mucho menos conocido que el de tipo Th2 y hasta ahora no se han demostrado terapias dirigidas frente a este endotipo que sean efectivas (Muraro *et al.*, 2016).

En la actualidad, para el asma, los biomarcadores tipo Th2 de uso clínico se limitan a la citometría cuantitativa de eosinófilos en esputo, al número de eosinófilos en sangre, a FE_{NO} , y a la IgE en suero. Además, la periostina es un marcador que está tomando cada más relevancia en la práctica clínica. Aun así Korevaaren (2015), demostró que en el asma grave, la correlación entre el número de eosinófilos en sangre, el FE_{NO} , la periostina y los niveles séricos de IgE con el número de eosinófilos en esputos es pobre. Así pues, los biomarcadores convencionales del asma Th2-alta, aun teniendo correlaciones, muestran una sensibilidad y especificidad limitada y nuevos biomarcadores con potencial no están disponibles aún para el uso rutinario en clínica debido a la falta de validación y estandarización. Además, aún existe mucha incertidumbre con respecto a la patología del asma Th2-baja, dando lugar a una falta de biomarcadores y de tratamientos efectivos para estos subtipos asmáticos (Richards *et al.*, 2018). El endotipo Th2-bajo está menos caracterizado y se asocia con la neutrofilia en las vías respiratorias y con una insensibilidad esteroidea de la obstrucción de las vías (Moore *et al.*, 2014; Mukherjee, Svenningsen y Nair, 2017). Algunos biomarcadores propuestos para este endotipo incluyen: la neutrofilia en sangre y esputo (Nadif *et al.*, 2016), la IL-6 sérica, la IL-8 en esputo, y la proteína elastasa de neutrófilos (Wood *et al.*, 2012). Todos tienen numerosas limitaciones (Cowan *et al.*, 2010). Aunque es posible que el asma neutrofílica represente un endotipo distinto dirigido por vías Th1/Th17 (Chesné *et al.*, 2014; Simpson *et al.*, 2014), esto es discutido por numerosos ensayos clínicos con resultados negativos que se han enfocado en la neutrofilia de las vías respiratorias (Busse *et al.*, 2013). Aunque las terapias de estos ensayos propuestos por Busse (2013) podrían demostrar una reducción de la neutrofilia en las vías respiratorias, no afectaron a la clínica y conllevaban riesgos potenciales de neutropenia e infección (O'Byrne *et al.*, 2016). Así pues, hay una necesidad clínica aún por satisfacer en el estudio de los mecanismos y los biomarcadores, para ambos endotipos de asma Th2-alta y Th2-baja, que podrían predecir la respuesta a un tratamiento dirigido (Lim y Nair, 2018). El desarrollo de biomarcadores sólidos en combinación con un entendimiento más profundo de la patología y fisiología del asma permitirá el tratamiento de los pacientes asmáticos de una forma más dirigida y efectiva a través de enfoques basados en la medicina de precisión (Richards *et al.*, 2018). Es necesario, por tanto, fomentar estudios que analicen factores genéticos y ambientales, con el fin de encontrar biomarcadores diferenciales de estos tipos de enfermedades, para intentar mejorar la prevención, el correcto diagnóstico y el tratamiento.

En resumen, mientras que los enfoques terapéuticos de hoy en día son efectivos en muchos pacientes, sigue habiendo una necesidad insatisfecha de más opciones de tratamiento para pacientes con asma, sobre todo el asma no controlada y grave. El endotipo Th2 ha sido el centro de atención para la búsqueda de biomarcadores y el desarrollo de aproximaciones terapéuticas biológicas mediante el tratamiento de la inflamación eosinofílica. Sin embargo, el endotipo no

Th2 se ha caracterizado poco (Berry y Busse, 2016). Por tanto, los esfuerzos dirigidos hacia este tipo de asma son claramente insuficientes y las terapias biológicamente dirigidas son un campo por desarrollar. A la larga, un planteamiento que modifique la enfermedad es lo deseable, y esto podría ser facilitado por el desarrollo intenso de terapias biológicas que tengan como diana vías inflamatorias específicas de la patogénesis del asma (Parulekar, Diamant y Hanania, 2017). Sin embargo, es importante identificar los pacientes que con mayor probabilidad responderían a este tipo de terapias. El potencial de los biomarcadores predictivos para conseguir esto, marcaría el cambio en la clasificación y tratamiento convencional del asma que en este momento se ajusta al enfoque “una talla encaja para todos” (Hanania y Diamant, 2017). En esta Tesis se busca corroborar la implicación génica y proteica de un número de genes asociados a las enfermedades asmáticas y alérgicas con el fin de definir su potencial como biomarcadores de diagnóstico para estas patologías y su gravedad.

OBJETIVOS

El asma y la alergia son enfermedades respiratorias complejas y multifactoriales, en las que intervienen factores ambientales y genéticos, fundamentales tanto para la aparición como para el desarrollo de la enfermedad. El avance biotecnológico de los últimos años ha proporcionado gran cantidad de información sobre potenciales biomarcadores y mecanismos moleculares que podrían permitir clasificar estas enfermedades en endotipos. Sin embargo, aún existe un gran desconocimiento a este respecto y una necesidad real de validar y definir el papel de estos biomarcadores, con el fin de conseguir establecer los mecanismos que causan la enfermedad de cada paciente, clasificarlos correctamente y hacer a medida el tratamiento que más beneficio les pueda aportar, en resumen, llevar la medicina de precisión a este tipo de enfermedades.

Acorde a esta idea, en esta Tesis se decidió analizar el potencial de 94 biomarcadores moleculares y definir su capacidad de discriminación entre asma y enfermedad alérgica y su gravedad, analizando muestras fáciles de procesar y no invasivas, derivadas de la sangre periférica, como son el suero y la fracción de células mononucleares (PBMC), en una población bien caracterizada clínicamente. El objetivo final es encontrar nuevas herramientas de diagnóstico y/o pronóstico que puedan ser fáciles de analizar.

Para ello, se obtuvieron muestras de suero y PBMC de 4 grupos clínicos con distintos fenotipos relacionados con el asma y la alergia, pacientes con asma no alérgica (ANA), pacientes con asma alérgica (AA), pacientes con alergia sin asma (AR) y sujetos controles sanos (C), en las que se cuantificaron los niveles de expresión génica y proteica de un grupo de genes asociados a estas enfermedades, para demostrar su utilidad como biomarcadores. En concreto y de forma más específica se planteó:

1. Definir el potencial de 94 genes, seleccionados por su asociación con la enfermedad asmática y alérgica, como biomarcadores génicos individuales para discriminar fenotipos clínicos y los subgrupos de gravedad asmática, mediante:
 - a. El análisis de la expresión génica diferencial.
 - b. Examinando la sensibilidad y especificidad por análisis de curvas ROC.
2. Definir el potencial de las proteínas codificadas por los genes más relevantes del estudio génico previo, como biomarcadores diferenciales de los distintos fenotipos clínicos, así como de los subgrupos de gravedad mediante:
 - a. La expresión proteica diferencial.
 - b. El análisis de la sensibilidad y especificidad de la expresión proteica de estos biomarcadores, de forma individual y/o combinada, mediante curvas ROC.

A la luz de los resultados, como objetivos secundarios, se decidió:

1. Determinar el papel de la epigenética y su importancia como mecanismo de regulación de la expresión génica de 5 genes seleccionados en base a su relevancia por los resultados anteriores, mediante el estudio de patrones diferenciales de metilación entre sujetos controles y pacientes con asma no alérgica grave.
2. Definir la procedencia celular a nivel periférico, de uno de los biomarcadores asociados a gravedad en nuestro estudio, clásicamente asociado a localizaciones tisulares. Para ello se analizó su expresión, en distintas subpoblaciones celulares de sangre periférica, procedentes de muestras de sujetos con varias patologías respiratorias (asma, alergia y EPOC).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIONES DE ESTUDIO

El estudio planteado es un diseño tipo casos-controles que cumple con los principios éticos aceptados internacionalmente por las Naciones Unidas y la Comisión Europea (Acta de Helsinki de 1964 y Ley 14/2007 de 3 de Julio de Investigación Biomédica). Se garantizó la confidencialidad de los pacientes de acuerdo a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y la ley de Protección de los Derechos de los Pacientes (Ley 41/2002). Para su correcto cumplimiento, el estudio contó con el dictamen favorable del Comité de Ética de los Hospitales en los que se seleccionaron los pacientes de estudio. La población de estudio principal (P1) estuvo constituida por 104 sujetos de cuatro grupos clínicamente definidos:

- Grupo 1: Sujetos controles (n=30) (C).
- Grupo 2: Sujetos asmáticos no alérgicos (n=30, 15 con asma grave y 15 con diagnóstico moderado-leve) (ANA).
- Grupo 3: Sujetos asmáticos alérgicos (n=30, 15 con asma grave y 15 con diagnóstico moderado-leve) (AA).
- Grupo 4: Sujetos alérgicos riniticos no asmáticos (n=14) (AR).

Se obtuvo una segunda población de estudio (P2), para la comprobación de ciertos resultados obtenidos en el estudio de la población principal, que se clasificó en los siguientes grupos:

- Grupo 1: Sujetos controles (n=11) (C).
- Grupo 2: Sujetos asmáticos no alérgicos (n=12, 6 con asma grave y 6 con diagnóstico moderado-leve) (ANA).
- Grupo 3: Sujetos asmáticos alérgicos (n=13, 7 con asma grave y 6 con diagnóstico moderado-leve) (AA).
- Grupo 4: Sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (n=11, 6 con diagnóstico grave y 5 con diagnóstico moderado-leve) (EPOC).

1.1. Criterios de selección

Las personas seleccionadas para este estudio debían cumplir una serie de criterios previamente establecidos: no llevar un tratamiento con corticoides, antihistamínicos o inmunoterapia que pudiera alterar los parámetros a determinar (en el momento de la toma de muestra de estudio) y haber firmado el consentimiento de participación en el estudio (previamente aprobado por el Comité Ético de todos los centros integrantes del proyecto).

1.2. Clasificación de los sujetos

La clasificación de los sujetos de estudio se realizó en los Servicios de Alergología y Neumología de los distintos hospitales participantes en este estudio, en base al historial clínico y a criterios diagnósticos: la exploración clínica, pruebas cutáneas y función pulmonar.

Exploración clínica: Se evaluó la ausencia o presencia de sintomatología alérgica, principalmente asma y/o rinitis.

Pruebas cutáneas: Se realizaron mediante la prueba intraepidérmica o *skin prick test* que permite determinar frente a qué sustancia está sensibilizado el individuo. Esta prueba se realiza frente a una serie de alérgenos. La batería estándar de aeroalérgenos empleados en las pruebas cutáneas son: ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Lepidoglyphus destructor*), epitelios (gato y perro), cucarachas (*Blattella orientalis* y *Blattella germanica*), pólenes (*Cupressus sempervirens*, *Platanus hispanica* Mill.ex Muenchb, *Olea europaea*, mezcla de gramíneas, *Artemisia*, *Parietaria* y *Salsola*) y hongos (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*) (Comité Ejecutivo de GEMA, 2017). Se valora su sensibilización aplicando una gota de las muestras con los alérgenos sobre la superficie volar de ambos antebrazos, utilizando como control negativo una solución de suero fisiológico y como control positivo histamina. Con una lanceta distinta cada vez, se presiona sobre la gota con el extracto de cada alérgeno penetrando en la piel sin ocasionar sangrado. Se valoraron como positivas las pápulas de diámetro superior a 3 mm con respecto al control negativo. El control con histamina debería ser positivo para asegurar que el procedimiento se ha realizado correctamente y para excluir resultados negativos provocados por la ingesta de algún medicamento (Heinzerling *et al.*, 2013).

Función pulmonar: Se determinó a través de FVC y FEV₁. Se diagnosticó a los pacientes con asma grave, moderada o leve según los criterios de la Guía Española del Manejo del Asma (GEMA) (Tabla 3). La GEMA clasifica a los pacientes con asma según varios criterios: la frecuencia de los síntomas diurnos y nocturnos, la obstrucción del flujo aéreo, la necesidad de usar agonistas adrenérgicos β_2 de acción rápida a demanda, la dosis de medicación necesaria y la limitación en la vida diaria. Además, esta clasificación considera el riesgo de exacerbaciones, el progresivo deterioro de la función pulmonar y la aparición de efectos secundarios ocasionados por la medicación anti-asmática administrada (Plaza Moral y Comité Ejecutivo de GEMA, 2009). La gravedad de la EPOC se clasifica según el sistema de clasificación GOLD (*Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD*) que se basa en los síntomas, el número de hospitalizaciones y la espirometría y se resume en la Tabla 6 (Vogelmeier *et al.*, 2017).

Tabla 6: Clasificación de la gravedad de la limitación del flujo aéreo en EPOC

GOLD 1	Leve	$FEV_1 \geq 80 \%$
GOLD 2	Moderada	$50 \% \leq FEV_1 < 80 \%$
GOLD 3	Grave	$30 \% \leq FEV_1 < 50 \%$
GOLD 4	Muy Grave	$FEV_1 < 30 \%$

Clasificación basada en el FEV_1 tras la administración de un broncodilatador. En estos estadios se clasifican los pacientes con un $FEV_1/FVC < 0,70$ (Vogelmeier *et al.*, 2017).

Según estos criterios se establecieron los grupos de estudio ya comentados:

- Sujetos C: Se clasificaron en este grupo todos aquellos individuos sanos, que no presentaban antecedentes ni sintomatología alérgica, ni historial de enfermedades respiratorias.
- Sujetos ANA: Se consideran pacientes con enfermedad asmática, cuyo diagnóstico de gravedad se valora según los criterios de GEMA y con resultados negativos en las pruebas cutáneas frente a una batería estándar de alérgenos.
- Sujetos AA: Se catalogan como pacientes con enfermedad asmática (gravedad evaluada según GEMA) y cuyo resultado en las pruebas cutáneas frente a al menos un aeroalérgeno.
- Sujetos AR: Son individuos alérgicos a algún polen que referían rinitis estacional sin asma durante la exposición al antígeno. En las pruebas cutáneas, todos presentaron reacciones positivas a extractos de pólenes, uno además a ácaros del polvo y epitelio animal, y otro, al melocotón.
- Sujetos con EPOC: Son pacientes sin asma ni alergia pero que presentan disnea, tos crónica o expectoración y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad. Es necesario realizar una espirometría para el diagnóstico en este contexto clínico. En ella, un cociente $FEV_1/FVC < 0,70$ tras la prueba broncodilatadora confirma la existencia de una limitación persistente del flujo aéreo e identifica la presencia de EPOC. La gravedad de la enfermedad se clasifica según el sistema de clasificación GOLD.

2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Los sujetos control y los sujetos alérgicos no asmáticos de P1 se seleccionaron y diagnosticaron clínicamente por un alergólogo especializado del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Los sujetos asmáticos (alérgicos y no alérgicos) de P1 procedieron del Banco de muestras de asma del CIBERES (Centro de

Investigación Biomédica en Red de enfermedades respiratorias), compuesto por más de 300 sujetos, de los cuales se dispone de una base de datos clínicos asociados de los que aproximadamente un 40 % tienen asma alérgica. El banco dispone de células mononucleares de sangre periférica o PBMC, suero y ADN. Las muestras que se utilizaron del banco procedían de cinco hospitales españoles pertenecientes a esta red: el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, el Hospital Doctor Negrín de las Palmas de Gran Canaria y los Hospitales Clinic y Sant Pau de Barcelona.

Todos los sujetos de la segunda población de estudio (P2) se seleccionaron y se diagnosticaron en los Servicios de Alergología y Neumología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

2.1. Recogida de muestras

De cada uno de los sujetos de estudio se extrajeron 30 ml de sangre completa, recogidos en dos tubos *Vacutette* con heparina, de 10 ml (Grenierbio-one, KremsmÜster, Austria) y un tubo *Vacutette* sin anticoagulante, de 10 ml (Grenierbio-one) para la obtención del suero. Cada muestra se envió en el menor tiempo posible (a temperatura ambiente), junto con los consentimientos informados y los historiales clínicos, al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) para su procesamiento.

2.2. Obtención de suero

La muestra de sangre sin anticoagulante se centrifugó durante 10 minutos a 2.100 g en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) para obtener el suero de los pacientes que se distribuyó, en alícuotas de 1,5 ml (tubos *Eppendorf*, Hamburgo, Alemania) y se almacenó a -80 °C en el Biobanco del IIS-FJD. El suero se utilizó para cuantificar los niveles de IgE y los niveles de proteína de algunos de los biomarcadores estudiados en esta Tesis.

2.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Este proceso se realizó en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar (Cultek, Madrid, España). El aislamiento se realizó mediante un gradiente de densidad utilizando la solución de aislamiento de linfocitos (*Lymphocytes isolation solution*, Comercial Rafer, Zaragoza, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada muestra de sangre periférica con heparina se mezcla de forma homogénea con un volumen igual de suero salino isotónico al 0,9 % en un frasco estéril. Posteriormente, se añade lentamente la mezcla de sangre y suero salino

a la solución de aislamiento de linfocitos, siguiendo una proporción 5:3 (sangre diluida: solución de aislamiento de linfocitos) en un tubo de 50 ml, para después, centrifugar las muestras a 460 g durante 20 minutos a 20 °C, sin freno, en una centrífuga *AllegraX-15R* (Beckman Coulter). Este proceso permite obtener distintas fases bien diferenciadas. La parte superior de color amarillento es el plasma. En la parte central, formando un anillo blanquecino, se obtienen las PBMC. En el sedimento inferior se sitúan las células de la serie roja (eritrocitos, plaquetas) y granulocitos (Figura 3). Se recoge la franja que comprende las PBMC y se lavan con 50 ml de suero salino, centrifugando a 675 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, en una centrífuga *AllegraX-15R* (Beckman Coulter). La parte superior de plasma se recogió y almacenó en alícuotas de 1,5 ml (tubos *Eppendorf*), a -80 °C, en el Biobanco del IIS-FJD, para su posible utilización en el futuro.

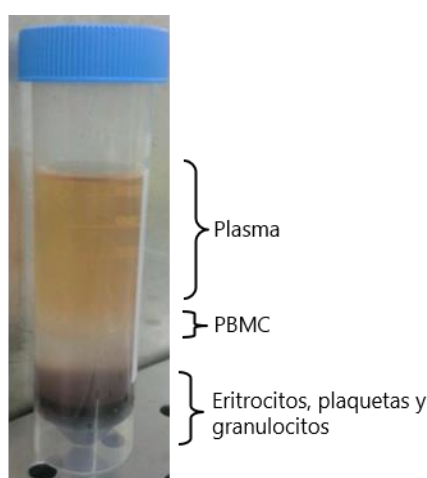


Figura 3: Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad.

Las PBMC aisladas se cuentan utilizando una técnica de tinción por exclusión, mediante el colorante azul tripán. Las células viables, con membrana intacta, no incorporan el azul tripán, por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas y aparecen coloreadas en el microscopio. Según el protocolo, se mezclan 10 μ l de las células resuspendidas en suero salino con 10 μ l del colorante azul tripán 0,4 % (Gibco, Carlsbad, California, Estados Unidos). Diez μ l de esta mezcla se aplican en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) que contiene cuatro cuadrantes de 16 cuadrados cada uno. Se cuentan las células presentes en dos de los cuadrantes, utilizando un microscopio óptico *Labophot* (Nikon, Tokyo, Japón) con un aumento de 40x. Para calcular el número total de células viables se procede según los cálculos:

Volumen de 1 cuadrante de 16 cuadrados = 0,1 mm³

Número de células en dos cuadrantes x 10⁴ = células/ml

Células/ ml x Volumen total (Vt) = número total de células

La viabilidad se calcula de la siguiente manera: Viabilidad (%) = $100 \times \text{células no coloreadas} / \text{n}^\circ \text{ total de células (células no coloreadas + células azules)}$.

Las PBMC aisladas se resuspenden en una solución de congelación que contiene el Medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Lonza, Verviers, Bélgica), 10 % de suero de ternera fetal (Lonza) inactivado (30 minutos a 56 °C) y dimetilsulfóxido al 10 % (DMSO, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) a una concentración de $7-10 \times 10^6$ células/ml en viales de criocongelación de 1,5 ml (Sterilin, Cambridge, Reino Unido). Las células se mantuvieron un mínimo de 24 horas a -80 °C y posteriormente se guardaron a -196 °C en nitrógeno líquido, hasta su uso. Las células, al igual que el resto de muestras obtenidas, se almacenaron en el Biobanco del IIS-FJD.

3. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE IgE TOTAL

Los niveles en suero de IgE total se determinaron por inmunoanálisis enzimático comercial *CAP IgE* (Phadia, Uppsala, Suecia) empleando el autoanalizador ImmunoCAP250 (Phadia). Los niveles de IgE total se expresan en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml).

4. DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Este proceso se realizó en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar (Cultek, Madrid, España). El primer paso consiste en la descongelación de las PBMC que se encontraban almacenadas en nitrógeno líquido. Según el protocolo, las células se resuspenden en 50 ml de suero salino con ayuda de una pipeta. Este proceso debe realizarse con rapidez para prevenir la formación de cristales (debido al cambio brusco de temperatura) y minimizar los efectos tóxicos de los crioprotectores que producirían daño y pérdida de viabilidad celular. La suspensión de células se centrifuga durante 10 minutos a 675 g, en una centrífuga *AllegraX-15R* (Beckman Coulter). El precipitado celular se resuspende en suero salino y se cuentan las células viables según el procedimiento descrito en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Repetimos el proceso de lavado, distribuyendo 1×10^6 células aproximadamente, en suero salino, en tubos *Eppendorf* de 2 ml y centrifugando a 12.000 g en una microcentrífuga *Mikro24-48* (Hettich, Tuttlingen, Alemania), para continuar con la extracción de los ácidos nucleicos y proteínas, tal y como se detalla a continuación.

5. EXTRACCIÓN DEL ARN

El proceso de extracción de ARN se realiza en un entorno libre de ribonucleasas, siguiendo el protocolo de *Trizol* (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El sedimento celular (1×10^6 PBMC) se resuspende en 800 μ l de *Trizol* (Invitrogen) en un tubo *Eppendorf* de 2 ml, y se agita en un agitador tipo *vortex* durante 5 minutos a temperatura ambiente, para conseguir la liberación de los ácidos nucleicos. A continuación, se añaden 160 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), se agita y se mantiene a temperatura ambiente durante 3 minutos para, posteriormente, centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se observan tres fases claramente diferenciadas: la fase superior acuosa donde se localiza el ARN, la interfase que contiene el ADN y la fase inferior de fenol/cloroformo que es la fase proteica.

La fase superior se recoge sin aspirar el anillo intermedio ni la fase inferior y se transfiere a un nuevo tubo *Eppendorf* de 2 ml, al que se añaden 400 μ l de isopropanol para precipitar el ARN. Las muestras se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación, se centrifugan a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se decanta y se lava el sedimento del ARN con 800 μ l de etanol al 75%, mediante centrifugación a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se elimina cuidadosamente para no aspirar el sedimento de ARN y se deja secar durante 10 minutos. Por último, se resuspende el sedimento en 25 μ l de agua libre de ribonucleasas (*Experion DEPC-Treated Water*, Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos) y se procede a cuantificar la cantidad del ARN extraído.

5.1. Cuantificación del ARN

La concentración de las muestras de ARN se midió en un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Bonsái Technologies Group, Madrid, España) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El programa informático utilizado fue *el Nanodrop 3.0.1*.

En primer lugar, se coloca una gota de 2 μ l de agua libre de ribonucleasas en el pedestal del lector para realizar la limpieza de la microcubeta. Posteriormente, se selecciona el programa de ácidos nucleicos y el tipo de medida a realizar (ARN). Se seca el pedestal y se coloca otra gota de 2 μ l de agua libre de ribonucleasas para realizar la medida del blanco. Se vuelve a secar el pedestal, se colocan 2 μ l de la muestra de ácido nucleico a cuantificar y se realiza la medida. El programa informa de la concentración de ARN de la muestra (expresado en ng/ μ l) en base a la absorbancia registrada a 260 nm (longitud de onda absorbida por los ácidos nucleicos), así como el estado de pureza en el que se encuentra, por medio del ratio 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm. La

presencia de picos a 280 nm indica presencia de contaminación proteica o fenol, lo cual afecta al ratio 260/280. El ratio considerado óptimo es 1,70-2,00. Otros contaminantes, como EDTA (siglas del inglés para ácido etilendiaminotetracético), carbohidratos o fenoles, absorben a 230 nm y por ello el ratio 260 nm/230 nm es también importante, considerándose que el rango óptimo debe estar entre 2,00-2,20. Todas las muestras de ARN utilizadas en este estudio cumplían estas condiciones de pureza y ausencia de contaminación.

6. EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se realizó siguiendo el protocolo de extracción de *Trizol* (Invitrogen). A la parte de la interfase (ADN) y la fase inferior (parte proteica) que queda al retirar la fase superior (ARN), se le añaden 240 µl de etanol 100 %. Mezclamos por inversión y se deja a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, la muestra se centrifuga a 2.000 g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante donde se encuentra la parte proteica (continúa el protocolo de extracción en el apartado 7 de Materiales y Métodos) y el sedimento se mezcla con 800 µl de citrato sódico en etanol al 10 %. Se incuban 30 minutos a temperatura ambiente, mezclando periódicamente, y se centrifuga a 2.000 g, 5 minutos. Se desecha el sobrenadante. Este paso se repite una vez más. Se lava con 1,6 ml de etanol al 75 % incubando 20 minutos a temperatura ambiente, mezclando de vez en cuando y tras esto, se centrifuga a 2.000 g, 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se deja secar de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente hasta que el etanol se haya evaporado. Después del secado, se disuelve el ADN en 30 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 8 mM. En este momento, se cuantifica su concentración (Apartado 6.1 de Materiales y Métodos). Para conservar el ADN, se ajusta el pH entre 7 y 8, con 0,1 M de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico) y EDTA a una concentración final de 1mM.

6.1. Cuantificación del ADN

La concentración de las muestras de ADN se midió en un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* de la misma forma que se hizo para el ARN, pero seleccionando en el programa informático como ácido nucleico el ADN.

7. EXTRACCIÓN PROTEICA

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el protocolo de extracción de *Trizol* (Invitrogen). Después del paso de etanol 100 % redactado en el apartado anterior de extracción de ADN (apartado 6), el sobrenadante se recoge y se añaden 1,2 ml de isopropanol, se agita con

un agitador tipo *vortex*, se deja a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos, para posteriormente desechar el sobrenadante. El *pellet* se resuspende en 1,6 ml de hidrocloreto de guanidina en etanol al 95 % (0,3M) y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras este paso, la muestra se centrifuga durante 5 minutos a 7.500 g y se desecha el sobrenadante (este proceso de lavado se realiza tres veces). Posteriormente, al *pellet* se añaden 1,6 ml de etanol al 100 % y se incuba 20 minutos, para luego centrifugar la muestra durante 5 minutos a 7.500 g. Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante y se deja secar el precipitado durante 10 minutos. Finalmente, el *pellet* proteico se disuelve en 100 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 1 %. Para ayudar a la disolución del *pellet*, se puede incubar a 50°C durante 10 minutos y resuspender cuidadosamente para no generar burbujas.

7.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica se realizó siguiendo el método del ácido bicinconínico (o BCA, sus siglas en inglés), utilizando el *Pierce BCA Protein Assay Kit* (ThermoScientific, Rockford, Estados Unidos). El principio de este método reside en que en un medio alcalino los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{2+} y estos, al unirse con moléculas de BCA, absorben luz a 562 nm. La absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. Para establecer la relación entre una cierta absorción y una determinada concentración de proteína, se prepara una serie de muestras estándares (concentraciones seriadas) de albúmina de suero bovino (BSA), desde 0 µg/ml hasta 2.000 µg/ml. Se pipetea, por duplicado, 25 µl de cada muestra estándar y cada una de las muestras a cuantificar, en placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, Estados Unidos). A cada pocillo se le añaden 100 µl del *BCA Working Reagent* (WR) preparado según las instrucciones de la casa comercial, es decir, mezclando 50 partes del *BCA Reagent A* con 1 parte del *BCA Reagent B*. La placa se incuba a 37 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción y, posteriormente, se mide la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placas. En este caso se usó el *Infinite F200* (Tecan, Männedorf, Suiza).

Una vez obtenidos los valores de absorbancias, se realiza una regresión lineal con los datos de las muestras estándares. En el eje de las X se indican la concentración en µg/ml y en el de la Y, la absorción, en unidades de absorción. Finalmente se interpola el valor de absorbancia obtenida para la muestra a cuantificar, para determinar la concentración proteica de la muestra. Esto se realiza con el programa de *Microsoft Excel*.

8. VALIDACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES DE ASMA Y ALERGIA

Debido a la gran cantidad de genes propuestos en la literatura científica como potenciales biomarcadores de la enfermedad asmática y la enfermedad alérgica y la falta de análisis comparativos combinados de distintas patologías respiratorias en el momento del diseño de este trabajo, se decidió seleccionar un panel de 94 genes, para definir su relevancia como diferenciadores de los distintos fenotipos clínicos reflejados en nuestra población de estudio (asma no alérgica, asma alérgica y alergia sin asma). Para ello, realizamos un exhaustivo análisis de la bibliografía científica en bases como *Pubmed* o *Medline*, buscando los potenciales biomarcadores mejor definidos para alguno de estos fenotipos clínicos, para posteriormente, seleccionar los 94 genes a validar en nuestra población, según los criterios de selección que se detallan en el siguiente apartado.

El estudio se diseñó para hacer un análisis de expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real o qRT-PCR, utilizando tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (detallado a continuación).

8.1. Selección de genes de estudio

Para decidir los genes de interés en nuestro estudio, establecimos los siguientes criterios:

1. Genes relevantes por su expresión diferencial en la patología asmática (alérgica o no) y por estudios de variantes polimórficas (SNP) en asma y alergia, obtenidos en más de un trabajo independiente, tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica en las bases científicas habituales (*Pubmed*).
2. Genes previamente definidos solo por nuestro grupo como significativos en alergia respiratoria, mediante análisis de expresión génica (Aguerri *et al.*, 2013).
3. Genes candidatos de interés por su participación en procesos o mecanismos como plasticidad celular, inflamación y/o regulación que podrían haber quedado excluidos por criterios anteriores.

Basándonos en estos criterios y por razones metodológicas, seleccionamos 94 genes para hacer un diseño de tarjetas microfluídicas. Además, se eligieron 2 genes endógenos o de referencia comúnmente utilizados en los estudios de expresión génica de PBMC: *18S* (subunidad de 18 unidades *Svedberg* del ribosoma) y *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

8.2. Análisis de muestras por qRT-PCR en tarjetas microfluídicas

Trescientos nanogramos de cada una de las muestras de ARN del estudio, extraídas según se indica en el apartado 5 de Materiales y Métodos, se alicuotaron en tubos *Eppendorf* de 0,5 ml y se enviaron a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Cantoblanco-UAM de Madrid, donde se realizó el estudio de los genes seleccionados mediante qRT-PCR.

El primer paso es realizar la transcripción reversa, para convertir el ARN en ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) mediante el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo de la casa comercial. En primer lugar, se prepara una reacción con un volumen final de 20 μ l, de los cuales 4 μ l corresponden a la mezcla de reacción *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems) que incluye enzima retrotranscriptasa, cebadores, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y el *buffer* de la reacción en concentraciones optimizadas por el fabricante. Se añade el volumen adecuado de material genético (aproximadamente 200 ng de ARN) y se ajusta con agua libre de ribonucleasas hasta los 20 μ l totales. La reacción de retrotranscripción (paso de ARN a ADNc) se realiza en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 60 minutos a 37 °C y 5 minutos a 95 °C.

Los cambios de expresión génica se analizaron mediante tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (Applied Biosystems). La expresión de cada gen se detecta mediante sondas *Taqman Gene Expression* (Applied Biosystems). Así, en cada uno de los 384 pocillos se insertan las sondas *Taqman* correspondientes al gen que se quiere validar. Cada placa tiene 8 puertos por los que se cargan hasta 100 ng de ADNc de cada muestra, diluidos en 50 μ l de *Master Mix Taqman Gene Expression* (Applied Biosystems) que contiene ADN Polimerasa *AmpliTaQ Gold* ultrapura, dNTP con deoxiuridina trifosfato (dUTP), un fluoróforo de referencia pasiva, ROX (o [5 o 6]-carboxi-X-rodamina), y componentes del *buffer*, en concentraciones optimizadas por el fabricante. A continuación, se centrifuga la placa a 1.200 rpm en una centrífuga *Heraeus* (ThermoScientific), durante 2 minutos, para resuspender las sondas *Taqman* y los cebadores. Posteriormente, se sella la placa con una selladora *Taqman Array Micro Fluidic Card Sealer* (Applied Biosystems) para evitar la evaporación de las muestras. La reacción se llevó a cabo en un sistema de cuantificación a tiempo real *7900HT System* (Applied Biosystems) con el programa *SDS Software* (Applied Biosystems) durante un total de 40 ciclos (15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C).

En este trabajo se realizaron 52 tarjetas microfluídicas, una tarjeta por cada dos sujetos del estudio (104 sujetos totales estudiados, por duplicado: 30 C, 30 ANA, 30 AA y 14 AR). En cada

una de ellas se analizó la expresión de los 96 genes (94 genes seleccionados más 2 genes de referencia: *18S* y *GADPH*) por duplicado.

8.3. Procesamiento de los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR

Para analizar las diferencias de expresión génica entre las distintas condiciones clínicas, se siguieron los siguientes pasos.

8.3.1. Normalización, filtrado de los resultados y análisis estadístico

La expresión de cada gen en cada muestra se calculó en base al ciclo umbral (Ct) en la qRT-PCR, siendo el Ct, el ciclo en el que la expresión del gen comienza a ser exponencial. La expresión de los 94 genes analizados se normalizó respecto a la expresión del gen endógeno *18S* (el gen que en nuestro caso daba mayor fiabilidad de los 2 analizados) siguiendo la expresión $\Delta Ct = [Ct(\text{gen})] - [Ct(18S)]$. Aquellas réplicas que presentaron una desviación estándar elevada (mayor que 0,30) y aquellas cuyo valor Ct fueron nulos, se descartaron del estudio. Un valor mayor de ΔCt implica una menor expresión génica y un ΔCt menor determina mayor expresión del gen. Se analizaron los datos obtenidos de las tarjetas microfluídicas comparando el $\Delta\Delta Ct$ (media del ΔCt de cada grupo $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{(\text{experimental})}] - [\Delta Ct_{(\text{control})}]$) entre el grupo control y grupo de cada condición clínica y finalmente, calculando el valor de cambio relativo o RQ (Cuantificación relativa) como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El nivel de significación de la expresión diferencial inicialmente se estableció en una $RQ < 0,5$ o > 2 y un valor de p ajustada menor de 0,05 por el método de *Benjamini-Hochberg FDR*.

La normalización, el filtrado de datos y el análisis estadístico (se fijó el umbral de significación estadística en un valor de p ajustada $\leq 0,05$) de cada una de las comparaciones establecidas, se realizaron mediante el programa *Stat Miner*. Además, con este mismo programa, se clasificaron las muestras según su expresión génica, con un modelo jerárquico no supervisado (*Heatmaps*) en el que se agrupan los genes y las muestras de ARN en función de su similitud. La sensibilidad de esta separación, es decir, la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo dentro de su grupo, se calculó de la siguiente forma (Fernández y Díaz, 2003):

$$\text{Sensibilidad} = \text{Verdadero Positivo} / (\text{Verdadero Positivo} + \text{Falso Negativo})$$

La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. Fue calculada con la siguiente fórmula:

Especificidad = Verdadero Negativo/ (Verdadero Negativo + Falso Positivo)

8.3.2. *Análisis de componentes principales*

Esta herramienta permite reducir la multidimensionalidad de los datos obtenidos del estudio de diferencias de expresión génica manteniendo las características que más contribuyen a su varianza, lo que facilita el análisis y la visualización de los datos. Matemáticamente, el PCA (siglas en inglés para análisis de componentes principales) transforma los datos a un sistema de coordenadas en el que la mayor varianza de la proyección de los datos se representan en la primera coordenada (primer componente principal) y la segunda mayor varianza en la segunda coordenada (segundo componente principal). Este análisis se realizó mediante el programa *StatMiner program* (<http://www.integromics.com/StatMiner>).

8.3.3. *Análisis estadístico de la expresión génica*

El programa utilizado para valorar si existe una expresión génica diferencial con múltiples comparaciones fue el *StatMiner program* (<http://www.integromics.com/StatMiner>). Este programa permite un análisis por pasos, que incluye análisis paramétricos, no-paramétricos, y test pareados para la cuantificación relativa de expresión génica, al igual que el análisis de expresión diferencial para dos factores por ANOVA. Aunque la significación se definió con un valor de $RQ < 0,5$ o > 2 y el valor de p ajustado ($< 0,05$), ajustando el valor de p (*raw p values*) con el método de *Benjamini-Hochberg FDR*, finalmente, optamos por un valor más restrictivo de $RQ < 0,25$ o > 4 , para seleccionar los genes con una expresión más diferencial entre las comparaciones realizadas.

Debido a la complejidad del estudio estadístico, contamos con la colaboración de expertos de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Cantoblanco-UAM (Madrid) quienes analizaron las comparaciones y corrigieron el valor de p . El objetivo era minimizar los falsos positivos del estudio (Benjamini y Hochberg, 1995) y controlar el FDR (*False Discovery Rate*), establecido en el 5%.

8.3.4. *Análisis funcional de los datos de expresión génica*

Aquellos genes que mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa en al menos una de las comparaciones, fueron nuevamente analizados desde un punto de vista funcional mediante dos programas informáticos: DAVID (siglas en inglés para base de datos de anotación, visualización y descubrimiento integrado) *Bioinformatics Resources* v6.7 y STRING (siglas en inglés para herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas interactivas) v10.

El programa DAVID *Bioinformatics Resources* v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) permite identificar patrones biológicos enriquecidos, particularmente términos GO (base de datos *Gene Ontology*) y descubrir genes funcionalmente relacionados. Para ello, se introducen los nombres de los genes en la base de datos y esta, los clasifica en grupos de genes que tienen una biología común. Debido a la múltiple funcionalidad de los genes, pueden aparecer en más de un grupo funcional. Para cada ruta o proceso biológico se obtuvo un valor de *Log Odds Ratio* (LOR), que proporciona información sobre el enriquecimiento de la vía/proceso. De tal modo que si en una determinada comparación el valor de LOR es positivo se considera que el bloque funcional está enriquecido para la primera condición de la comparación, mientras que si el valor es negativo, el bloque funcional está enriquecido en la segunda condición.

Para evaluar las diferencias estadísticas en una determinada comparación, para un proceso biológico o ruta funcional, se usó el estadístico *t-limma* moderado. Sobre este, se calculó el valor de p y se realizaron correcciones convencionales de *multiple testing* (Benjamini y Hochberg, 1995). Se definió la significación estadística en $p \leq 0,05$.

Por otro lado, las interacciones entre las proteínas codificadas por los genes se analizaron utilizando la base de datos STRING v10 (*Known and Predicted Protein-Protein Interactions*) (<http://string-db.org/>). Se introdujo el listado de las proteínas codificadas por los genes con expresión diferencial en la pestaña *Multiple names*. La base de datos devuelve un gráfico con información detallada de cada proteína y sus conexiones con otras. Indica además qué fuentes ha utilizado para las distintas conexiones:

- ***Neighbourhood (proximidad)***. Proteínas con un contexto genómico similar en diferentes especies, lo que sugiere una función parecida.
- ***Fusion-fission events (eventos de fusión)***. Proteínas fusionadas en algunos genomas, donde muy probablemente funcionan juntas, aunque en otros genomas no estén fusionadas.
- ***Occurrence (concordancia)***. Proteínas con una función similar o que aparecen en la misma vía metabólica. Suelen expresarse juntas o tener un perfil filogenético similar.
- ***Coexpression (co-expresión)***. Asociación predictiva entre genes basada en los patrones de expresión simultánea.
- ***Experiments (experimentos)***. Interacciones proteicas obtenidas a partir de otras bases de datos de interacciones proteína-proteína.

- **Databases (bases de datos).** Interacciones de grupos de proteínas descritas en las bases de datos.
- **Textmining (anotación).** Interacciones entre grupos de proteínas extraídos a partir de la literatura científica.

Las proteínas con funciones relacionadas tienen distribuciones conectadas y estables en su expresión génica. Con todos estos datos, se mejora el conocimiento acerca de la conectividad de los genes implicados y pueden priorizarse futuros ensayos funcionales.

9. ESTUDIO EPIGENÉTICO

Se estudiaron las modificaciones epigenéticas de metilación de los genes encontrados en esta Tesis que se asocian con la gravedad del asma no alérgica: *CHIL3*, *MSR1*, *PHLDA1*, *PI3* y *SERPINB2*. Este estudio pretende definir si hay o no diferencias de metilación en los genes que puedan explicar las diferencias de expresión previamente obtenidas. En caso afirmativo, se analizará la correlación de esta metilación con la expresión génica y proteica. Para su correcta interpretación hay que tener en cuenta que hipermetilación teóricamente supone represión génica e hipometilación, un aumento de la expresión génica.

El análisis de metilación se realizó en el ADN extraído de las PBMC de una población piloto de 12 sujetos sanos control y 12 sujetos con diagnóstico de asma no alérgico grave. Este método comenzó con el tratamiento del ADN genómico con bisulfito sódico: un total de 500 ng de ADN genómico se trató con bisulfito sódico utilizando el *EZ ADN Methylation-Gold Kit* (Zymo Research, Irvine, California, Estados Unidos), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se continuó con una amplificación por PCR en la cual se introdujo una diana del promotor de la polimerasa T7. La reacción de PCR se realizó en placas de 96 pocillos, con un volumen final en cada uno de 15 µl conteniendo 20 ng de ADN modificado con bisulfito, 1x de *Fast Start PCR Master* (Roche, Basilea, Suiza) y 0,4 µM de cada cebador. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización (94 °C durante 5 minutos), 45 ciclos de amplificación (94 °C durante 20 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto) y 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 3 minutos). Para reducir la variabilidad de la cuantificación de la metilación debida a la PCR (Coolen *et al.*, 2007), se realizaron tres réplicas de amplificación para cada una de las muestras. Se agregaron 2µl de la enzima SAP (fosfatasa alcalina de gamba) por cada 5 µl del producto de amplificación para defosforilar los dNTPs no incorporados en la PCR (estas muestras posteriormente se nombran como PCR/SAP). Las placas se incubaron a 37 °C durante 20 minutos, seguidos de 5 minutos a 85 °C.

El promotor de T7 se utilizó para realizar una transcripción in vitro a ARN sobre la cadena reversa incorporando desoxicitidilato (dCMP). El ARN obtenido se trató con ribonucleasa A o RNasa A (específica de pirimidinas), la cual corta la secuencia diana específicamente en la base uracilo, ya que durante la transcripción ha incorporado dCMP en el ARN transcrito. Para esto, se preparó una mezcla de transcripción/ RNasa A para una placa de 384 pocillos considerando un volumen final de 5 µl por pocillo. La mezcla contiene 0,64x de buffer de polimerasa T7, 3,14 mM de ditiotretitol (DTT), 22 unidades de polimerasa T7 y 0,09 mg/ml de RNasa A. En una nueva placa se colocaron 2 µl de las muestras PCR/SAP y se agregaron 5 µl de la mezcla transcripción/RNasa A, se centrifugó la placa 1 minuto y se incubó a 37 °C durante 3 horas. Para el acondicionamiento de las muestras para el análisis, se agregaron 20 µl de ddH₂O (agua bidestilada) a cada pocillo de la placa de 384 y 6 mg de resina de limpieza *Clean Resin*. Se dejó en rotación 10 minutos y se centrifugó 5 minutos a 3.200 g. Utilizando el nanodispensador *MassARRAY Nanodispenser* se transfirieron 10 nl de los productos de reacción al *bioarray SpectroCHIP*. El espectro de las reacciones de escisión es captado por el sistema *MassARRAY Analyzer* (Agena Bioscience, Hamburgo, Alemania) y los resultados son analizados con el software *EpiTYPER*. La tecnología *MassARRAY EpiTYPER* (Sequenom, San Diego, California, Estados Unidos) combina la escisión de ácidos nucleicos específica de bases con el análisis cuantitativo de alta resolución de la metilación del ADN (basado en el tratamiento de bisulfito sódico) por espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) (Ehrich *et al.*, 2005). Los productos de escisión que contienen uno o más sitios CpG (citosa-fosfato-guanina) se denominan unidades analíticas CpG. Estos fragmentos difieren en tamaño y en masa debido a su composición nucleotídica, generando un patrón de señales distintivo para el ADN metilado y no metilado que es analizado y cuantificado con el sistema *MassARRAY*. Las diferencias en el perfil de metilación del ADN analizado darán lugar a cambios en la secuencia de nucleótidos después del tratamiento con bisulfito, los cuales a su vez darán diferentes masas en los fragmentos. La abundancia de cada fragmento (nivel de señal/ruido en el espectro) es indicativa de la cantidad de metilación del ADN en la secuencia analizada.

El diseño de los cebadores (que se realizó considerando regiones de amplificación con una longitud de un máximo de 375 pares de bases) se realizó mediante el análisis de zonas próximas a la región promotora en todos los genes. Este análisis consistió en el estudio de regiones ricas en aminoácidos de citosina seguidos de guanina (también llamadas islas CpG). Se realizó una búsqueda en la literatura científica de zonas con el mayor número de islas CpG próximas a la región promotora para diseñar estos cebadores. Los cebadores utilizados se diseñaron con el software *SEQUENOM EpiDesigner BETA* (www.epidesigner.com). Los cebadores reversos tienen incorporada la secuencia del promotor de la polimerasa T7 [5'-

CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCT-3'] y los cebadores directos una secuencia de 10 nucleótidos para equilibrar la PCR [AGGAAGAGAG]. Estos cebadores son independientes del estado de metilación del ADN. Los cebadores utilizados, el tamaño de las regiones amplificadas y los sitios CpG que se incluyen en este amplicón se muestran en la Tabla 7. Los cebadores diseñados permitieron estudiar 5 islas CpG, próximas a la zona promotora en *MSR1*, *PI3* y *SERPINB2*, 8 en *CHI3L1* y 35 en *PHLDA1*. El estudio de metilación fue realizado por la empresa *Making Genetics*.

Tabla 7: Cebadores para el análisis cuantitativo de la metilación de las regiones seleccionadas por *MassARRAY EpiTYPER*

Gen	Cebadores (5' - 3')	Amplicón (pares de bases)	Sitios CpG - Cobertura
<i>CHI3L1</i>	F-aggaagagagTTTTATAGGTTGGGTAAGGGTTAGA R-cagtaatacgcactcactataggagaaggctCATCAAACCTAAATTCCTAAACCTC	354	8 – 6
<i>MSR1</i>	F-aggaagagagGTAGTTATTTTGTGTTTAAATAGGAG R-agtaatacgcactcactataggagaaggctAACCAATAACATTTATACTAATCCAAAC	313	5 – 5
<i>PHLDA1</i>	F-aggaagagagTTTGTAGGGAAAGTTTATAGGTTT R-cagtaatacgcactcactataggagaaggctTCAAAAATACTCCCTATCCTAACCC	362	35 – 28
<i>SERPINB2</i>	F-aggaagagagTTATTTAGGAGGTTGAGGTAGGAGG R-cagtaatacgcactcactataggagaaggctCAAAATAAACTCCATCTCAAAAACA	372	5 – 5
<i>PI3</i>	F-aggaagagagTTTGTAGGGAAAGTTTATAGGTTT R-cagtaatacgcactcactataggagaaggctTCAAAAATACTCCCTATCCTAACCC	335	5 – 5

Sitios CpG: islas CpG que se estudiaron. Cobertura: Islas CpG de las que la técnica pudo obtener un resultado positivo. El resto no se detectaron por limitaciones de la propia técnica.

9.1. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de metilación de las islas CpG de los sujetos C y los ANA graves se analizaron por el test T de Student no pareado con programa estadístico *GraphPad InStat 3*.

10. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA

Para comprobar si las modificaciones encontradas en la expresión de los diversos genes se correlacionan con cambios a nivel proteico, se cuantificaron los niveles de proteínas de algunos genes seleccionados previamente como diferenciales entre las distintas condiciones experimentales. Para realizar este estudio, se extrajeron las proteínas de PBMC (Apartado 7 de Materiales y Métodos) para analizar los niveles de tres biomarcadores por *western blot* y se analizó, de otros cuatro, su concentración proteica en suero mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). La elección de una técnica u otra para la realización de este estudio dependió tanto de la naturaleza de cada proteína como de la disponibilidad del producto necesario para la valoración de cada biomarcador en las distintas casas comerciales. Para valorar las diferencias

entre los niveles de expresión proteica de los distintos grupos clínicos se realizó el test de T de Student no pareado con el programa *GraphPad InStat 3*.

10.1. Análisis por *western blot*

Esta técnica separa una mezcla de proteínas en base a su masa molecular mediante un gel de poliacrilamida. Las proteínas separadas en el gel se transfieren a una membrana, dando lugar a un patrón de bandas proteicas. La membrana se incuba con anticuerpos marcados con una enzima y específicos de la proteína de interés. Los anticuerpos que se unen a la proteína de interés, se detectan ya que la enzima unida al anticuerpo reacciona con un sustrato que le suministramos. El sistema de revelado utilizado en nuestros ensayos fue el de quimioluminiscencia con luminol o LCL. Con este sistema de revelado, el producto de la reacción da lugar a luminiscencia en una cantidad proporcional a la de la proteína de interés. El grosor de la banda da una idea de la cantidad de proteína, por lo que se puede estandarizar para obtener la cantidad de proteína que hay en la muestra.

El extracto proteico obtenido de las PBMC de los sujetos de estudio se cuantificó mediante la técnica de BCA (Apartado 7.1. de Materiales y Métodos) realizándose la electroforesis en SDS-PAGE (dodecil sulfato sódico-electroforesis en gel de poliacrilamida). Se prepararon geles al 12 % en *cassettes Novex* (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) formados por una parte inferior separadora (tampón del gel separador (Tris-HCl 1 M a pH 8,8), 50 % de acrilamida/bisacrilamida (en una proporción 29:1), 10 % de SDS, 10 % de APS (de las siglas en inglés para persulfato amónico) y TEMED (acrónimo de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina) al 100 % y otra superior concentradora (tampón del gel concentrador (Tris-HCl 0,375M a pH 6,8), 50 % de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 10 % de SDS, 10 % de APS y TEMED al 100 %). El tampón de electroforesis utilizado estaba constituido por Trizma base 25 mM, glicina 0,2 M y SDS al 0,1 %. La fracción proteica se carga en distintos pocillos con un agente reductor (*Bolt Reducing Agent* a concentración 1x, de Life Technologies) y un tampón de carga (*Bolt LDS Sample Buffer* a 2,5x, de Life Technologies), siendo anteriormente desnaturizada a 70°C durante 10 minutos. La cantidad de proteína cargada en el gel depende de la especificidad del anticuerpo primario que se utilice y para ello se hicieron pruebas de optimización: el rango de carga fue de 10 µg a 40 µg (Tabla 8). La electroforesis se realizó a 125 V durante 90 minutos. Se utilizó el sistema *Blot Dry Blotting* de Invitrogen para la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa. Para el bloqueo y lavado de la membrana y la detección de las bandas se usó el *kit Western Breeze Chemiluminescent Western Blot Immunodetection* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Brevemente, tras realizar la transferencia, se procede al bloqueo de la membrana con

10 ml de una mezcla del diluyente A y el diluyente B (en una proporción 2:1) (Invitrogen) durante aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, se incubó la membrana a 4 °C toda la noche con 10 ml del anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. El anticuerpo primario se prepara a distintas diluciones según la proteína que se estudie (Tabla 8). Después de 3 lavados con 10 ml del tampón de lavado a 1x del *kit*, se incubó con 10 ml del anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (*ready-to-use anti-rabbit secondary antibody solution*, Invitrogen) (a temperatura ambiente durante 30 minutos). Tras varios lavados y con cuidado de no tocar la superficie de la membrana, se añadieron 2,5 ml del sustrato de quimioluminiscencia proporcionado por el *kit* sobre la membrana, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se elimina el excedente del líquido secando con papel de filtro. El revelado se realiza con el equipo *Amersham Imager 6000* (GE Healthcare LifeSciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) que recoge la quimioluminiscencia y digitaliza en una imagen las bandas correspondientes a cada proteína.

Tras el revelado, algunas de las membranas de nitrocelulosa (en concreto de SERPINB2 y PHLDA1) se deshibridaron mediante la solución *Re-blot Plus* (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos), con una dilución 1:20 en agua destilada, para posteriormente, volverlas a hibridar con el control de carga.

Los tres biomarcadores estudiados por esta técnica fueron MSR1 (receptor *scavenger* 1 de macrófagos), SERPINB2 (inhibidor de la serpin peptidasa, subtipo B (ovalbumina), miembro 2) y PHLDA1 (miembro 1 de la familia A con homología al dominio de *plesketrin*), ya que o no son proteínas solubles o no existe un kit comercial de ELISA para su estudio y si un anticuerpo para su análisis por *western blot*.

La expresión proteica de MSR1, se estudió en el grupo C (9 sujetos) y en el ANA (19 pacientes: 8 con diagnóstico grave y 10 moderados-leves), ya que los datos de expresión génica mostraron un incremento en estos sujetos enfermos y una asociación con la gravedad.

En el caso de *SERPINB2* y *PHLDA1*, al tratarse de genes relevantes en mayor o menor medida en todos los grupos clínicos estudiados, el análisis se realizó en la población total de P1. SERPINB2 se evaluó en 6 sujetos C, 11 ANA: 6 con asma grave y 5 con diagnóstico moderado-leve, 11 AA: 6 con asma grave y 5 con diagnóstico moderado-leve, y 5 AR; y para PHLDA1 se analizaron las muestras de 8 sujetos C, 5 ANA (3 pacientes graves y 2 moderados-leves), 6 AA (3 pacientes graves y 3 moderados-leves) y 7 AR.

Tabla 8: Características de los anticuerpos utilizados en los análisis por *western blot*

Anticuerpo Primario	Realizado en	Dilución utilizada	Masa molecular de detección	Cantidad de proteína/pocillo	Casa Comercial
IgG Anti- β -actina humano	Conejo	1:1.000	49 KDa	-	Cell Signaling Technology
IgG Anti-MSR1 humano	Conejo	1:2.500	75 KDa	40 μ g	Thermo Fisher Scientific
IgG Anti-SERPINB2 humano	Conejo	1:1.000	49 KDa	10 μ g	R&D Systems
IgG Anti.-PHLDA1 humano	Conejo	1:500	48 KDa	10 μ g	Invitrogen

Todas las características de los anticuerpos utilizados para este análisis se resumen en la anterior Tabla (Tabla 8). Las condiciones utilizadas para cada proteína a estudiar fueron puestas a punto en ensayos de optimización de cantidad de proteína total necesaria y de dilución de anticuerpo, basándose en las especificaciones de cada casa comercial. El control de carga de la técnica fue la β -actina (masa molecular 49 KDa) (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, Estados Unidos). Los resultados de cada biomarcador se relativizaron frente a β -actina (expresándose en unidades de cuantificación relativa o CR) a través del densitometrado de las bandas realizado mediante el programa *Image Quant LAS 4000* (GE Healthcare Life Science) para comprobar los niveles proteicos y su variabilidad en función del fenotipo clínico.

10.2. Análisis por ELISA

El estudio y cuantificación de las proteínas solubles se realizó con la técnica ELISA. Es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo primario inmovilizado en una placa detecta el antígeno, el cual es reconocido por un anticuerpo secundario marcado con biotina, que a su vez, se le une un anticuerpo con una enzima enlazada, que es capaz de generar un producto detectable por cambio de color al reaccionar con el sustrato cromógeno adecuado. La intensidad del color permite medir indirectamente el antígeno en la muestra mediante espectrofotometría. Con esta técnica medimos la cantidad de IL-8 (interleucina 8), CHI3L1, (quitinasa 3 similar a la 1), PI3 (inhibidor de la peptidasa 3), POSTN (periostina) e IL-10 (interleucina 10), en el suero de nuestros sujetos de estudio, según el protocolo especificado en los kits correspondientes: *human IL-8 ELISA kit* (rango de detección: 62,50-2.000 pg/ml) de Diaclone (Besazón, Francia), *human Chitinase 3-like 1 DuoSet ELISA* (rango de detección: 31,20-2.000 pg/ml), *human Trappin-2/Elafin (PI3) DuoSet ELISA* (rango de detección: 31,20-2.000 pg/ml), *human Periostin/OSF-2 DuoSet ELISA* (rango de detección: 62,50-4.000 pg/ml) de R&D systems y *human Interleukin-10 ELISA*

(rango de detección: 16-1.000 pg/ml) de ImmunoTools (Friesoythe, Alemania), cuya detección se realiza a 450 nm en un espectrofotómetro de placas *Infinite* F200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Estas proteínas se pudieron evaluar mediante esta técnica, ya que son proteínas que se secretan y son solubles en suero. Al tratarse de proteínas relevantes en mayor o menor medida en todos los grupos clínicos estudiados y al disponer de suficiente muestra de suero para realizar las cuantificaciones, el análisis se realizó en la población total de estudio (P1).

10.3. Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos de los niveles de las proteínas estudiadas se realizaron por el test T de Student no pareado, utilizando el programa *GraphPad InsStat 3*. La significación estadística se estableció en un valor *p two tailed* o valor *p bilateral* < 0,05.

11. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD POR CURVAS ROC

El estudio por curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) permite estimar la sensibilidad *vs.* la especificidad de cada uno de los posibles biomarcadores o combinaciones de biomarcadores analizados, en cada tipo de discriminación fenotípica. El área bajo la curva (AUC o *Area Under the Curve*) es una medida efectiva y exacta con capacidad para evaluar el poder de los test para discriminar el estado real de los sujetos, estableciendo valores de corte óptimos. Así pues, con este análisis, se puede estudiar la capacidad de los genes o proteínas estudiadas para discriminar las distintas condiciones clínicas de nuestra población, además de la gravedad de la enfermedad asmática, en los sujetos que padecen de esta patología, definiendo su potencia como biomarcadores. La clasificación se realizó según los valores AUC, pero como corrección frente al pequeño tamaño muestral, se destacarán como más relevantes los de mayor potencia estadística, es decir, los que poseen un intervalo de confianza (IC) del 95 % entre 0,70 y 1. Como guía para interpretar las curvas ROC, se establecen los siguientes intervalos para los valores de AUC: 0,50-0,60 test malo, 0,61-0,75 test regular, 0,76-0,90 test bueno, 0,91-0,96 test muy bueno y 0,97-1 test excelente. Se realizaron los estudios del valor AUC de forma cuantitativa y cualitativa pero se optó por el criterio del valor AUC cuantitativo porque permite definir umbrales de separación entre grupos de forma objetiva y por tanto, es de mayor utilidad.

Los potenciales biomarcadores se analizaron a nivel génico, analizando los valores medios de expresión de cada gen y cada sujeto y a nivel proteico, la cuantificación relativa o la concentración sérica (según la proteína haya sido analizada por *western blot* o por ELISA, respectivamente) de cada proteína y sujeto. Estos estudios se realizaron con el programa R.

Se estudiaron los marcadores génicos y proteicos de forma individual y combinada de dos en dos o de tres en tres. Las comparaciones realizadas fueron:

1. Cada fenotipo clínico (ANA, AA y AR) respecto al grupo control.
3. Cada subfenotipo de pacientes asmáticos atendiendo a la gravedad (grave o moderada-leve) respecto al grupo control.
4. Además, dentro de los grupos con pacientes asmáticos, se compararon los biomarcadores entre graves y moderados-leves.
5. Todos los fenotipos y subfenotipos clínicos entre sí.

12. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Se realizaron distintos estudios para determinar la posible correlación entre los resultados génicos, proteicos y los relacionados con los parámetros clínicos y de función pulmonar, en los diferentes fenotipos clínicos. Para analizar las correlaciones entre los distintos parámetros y su significación estadística, se hizo un análisis de correlación de Pearson mediante el programa *GraphPad InStat 3*. Se consideró una correlación fuerte a partir de un coeficiente $r \geq 0,80$, moderada entre los valores 0,79-0,50 y débil $r < 0,50$.

13. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE MSR1 EN SUBTIPOS CELULARES DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Debido a la relevancia de *MSR1* en nuestros resultados génicos, se decidió demostrar la expresión de este receptor de membrana (clásicamente asociado a localizaciones tisulares) en muestras periféricas, intentando caracterizar la población o poblaciones celulares en las que se expresa, así como, analizar si existen diferencias de expresión en distintas patologías respiratorias. Además, como *MSR1* también se ha asociado con la gravedad de la EPOC (Thomsen *et al.*, 2011; Ohar *et al.*, 2010), se recogieron muestras de sangre de una nueva población (P2) en la que se incluyeron pacientes con esta enfermedad (las características de esta población están descritas en el Apartado 1 de Materiales y Métodos). Para demostrar la presencia y la importancia de MSR1 en células de muestras de sangre periférica se utilizaron dos aproximaciones: la citometría de flujo y la microscopía confocal.

13.1. Análisis de expresión por citometría de flujo

La citometría es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser, la luz transmitida se dispersa por su paso a través de las células, señal que es recogida por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células. También permite el análisis multiparamétrico simultáneo de otras características físicas y químicas, pudiendo detectar distintos marcajes de partículas con fluorocromos. Esta técnica se utilizó para medir la expresión de MSR1 en distintas poblaciones celulares directamente en sangre total y también en PBMC aisladas.

13.1.1. Estudio de expresión de MSR1 en poblaciones celulares de sangre completa

En la población P2, se realizó la detección de MSR1 por citometría de flujo en las muestras de sangre completa y en PBMC aisladas (Apartado 2.3. de Material y Métodos) de cada paciente para comparar su expresión.

Cien microlitros de sangre (recogida en tubos *Vacutette*, Grenierbio-one, de 10 ml con heparina) por tubo de ensayo (BD Bioscience, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) se incubaron con el correspondiente anticuerpo marcado con fluorescencia, siguiendo en cada caso las indicaciones específicas de la casa comercial de cada anticuerpo. Para marcar MSR1, se utilizó el mismo anticuerpo usado en la técnica de *western blot* y un anticuerpo secundario de cabra, específico de IgG de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas, Estados Unidos) marcado en FITC (siglas en inglés para isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato). Además, se realizó el marcaje simultáneo de varias subpoblaciones celulares con una batería de anticuerpos (BD Bioscience): para detectar los linfocitos T CD4⁺ (positivos para el cúmulo de diferenciación 4) se utilizó el anticuerpo monoclonal IgG₁, κ de ratón, específico de CD4 humano, marcado con PE (siglas en inglés para la ficoeritrina); para detectar los linfocitos T CD8⁺ (positivos para el cúmulo de diferenciación 8), el anticuerpo monoclonal IgG₁ de ratón, específico del CD8 humano marcado con PE; para los linfocitos B⁺, el anticuerpo monoclonal la IgG₁, κ de ratón, específico de CD19 (cúmulo de diferenciación 19) humano, marcado con PE y finalmente, para caracterizar los monocitos, el anticuerpo monoclonal IgG₂ de ratón, específico de CD14 (cúmulo de diferenciación 14) humano, marcado con PC7 (siglas en inglés para la ficoeritrina cianina 7).

Los análisis realizados por sujeto de estudio fueron:

1. Control negativo: sin ningún anticuerpo.
2. Control FITC positivo: anticuerpo 1^{ario} de MSR1 a una dilución 1:100 + anticuerpo 2^{ario} marcado con FITC, dilución 1,5:100.
3. Control de isotipo, FITC negativo: anticuerpo 2^{ario} marcado con FITC, dilución 1,5:100.
4. Control PE positivo: anticuerpo anti-CD4 marcado con PE, dilución 1:50.
5. Control de isotipo, PE negativo: control de isotipo IgG₁ marcado con PE y hecho en ratón, dilución 1:50.
6. Control PC7 positivo: anticuerpo anti-CD14 marcado con PCy7, dilución 1:20.
7. Control de isotipo, PC7 negativo: control de isotipo IgG₁ marcado con PCy7 y hecho en ratón, dilución 1:20.
8. Doble marcaje MSR1⁺CD4⁺: anticuerpo 1^{ario} de MSR1, dilución 1:100 + anticuerpo 2^{ario} marcado con FITC, dilución 1,5:100 + anticuerpo anti-CD4 marcado con PE, dilución 1:50.
9. Doble marcaje MSR1⁺CD8⁺: anticuerpo 1^{ario} de MSR1, dilución 1:100 + anticuerpo 2^{ario} marcado con FITC, dilución 1,5:100 + anticuerpo anti-CD8 marcado con PE, dilución 1:10.
10. Doble marcaje MSR1⁺CD19⁺: anticuerpo 1^{ario} de MSR1, dilución 1:100 + anticuerpo 2^{ario} marcado con FITC, dilución 1,5:100 + anticuerpo anti-CD19 marcado con PE, dilución 1:10.
11. Doble marcaje MSR1⁺CD14⁺: anticuerpo 1^{ario} de MSR1, dilución 1:100 + anticuerpo 2^{ario} marcado con FITC, dilución 1,5:100 + anticuerpo anti-CD14 marcado con PC7, dilución 1:20.

Para el marcaje, se incubó primero el anticuerpo para MSR1 en los tubos correspondientes en 100 µl de PBS 1x/BSA al 1 %, incubándolo 40 minutos a 4 °C. Después, se lavó añadiendo 1 ml de tampón fosfato salino o PBS 1x a pH 7,4, agitando y centrifugando a 1.400 g a 4 °C, 5 minutos, en una centrífuga *AllegraX-15R* (Beckman Coulter). Después, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió suavemente el precipitado de células y se añadió el anticuerpo secundario marcado en FITC en los tubos correspondientes con BSA 1 % en PBS 1x, incubándose durante 40 minutos a 4 °C y en oscuridad. Posteriormente, se lavó de nuevo con PBS 1x y se incubaron, de la misma manera que en el paso anterior, el resto de anticuerpos que marcan las poblaciones celulares a estudiar. Tras un lavado, se procedió a realizar la lisis de eritrocitos, que por su autofluorescencia natural dan falsos positivos en la lectura de la citometría.

Para ello, se añadieron 2 ml de tampón de lisis (compuesto por cloruro de amonio (NH_4Cl) 154 mM, bicarbonato de potasio (KHCO_3) 10 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7,5) a 4 °C a cada tubo de ensayo, se agitó bien y se incubó a 4 °C durante 10 minutos en oscuridad. Tras esto, se centrifugó 5 minutos a 300 g, a 4 °C. Puede ocurrir que haya que repetir este paso una vez, si se observa aún un pellet rojo de eritrocitos. Tras la lisis, se lavaron las células con PBS 1x como en pasos anteriores para, tras eliminar el sobrenadante, resuspender el precipitado de células ya marcadas, con 100 µl de PBS 1x y 200 µl de tampón *FACS Flow* (*Fluorescence-Activated Cell Sorting Flow*) (BD Bioscience) a 4 °C y proceder a la medición de la fluorescencia en el citómetro de flujo *FACS Canto II* (BD Bioscience). La visualización de los resultados se realizó con el programa *BD FACS Diva* (BD Bioscience).

13.1.2. Estudio de expresión de MSR1 en poblaciones celulares de células mononucleares de sangre periférica

Para el análisis de las PBMC, se utilizaron células descongeladas (según el protocolo descrito en el Apartado 4 de Materiales y Métodos), que tras cuantificarse (Apartado 2.3 Materiales y Métodos) se dividieron en 1×10^6 células por cada muestra a ser analizada por citometría, en tubos de ensayo (BD Bioscience) en PBS 1x. El esquema de muestras fue el mismo que en el apartado anterior (13.1.1). Se lavaron de la misma forma detallada para la sangre en el Apartado 13.1.1. de Materiales y Métodos y se bloquearon con 100 µl de PBS 1x/BSA al 1 % durante 30 minutos a 4 °C. A continuación se procedió al marcaje celular, con el mismo protocolo descrito (Apartado 13.1.1. Materiales y Métodos), excepto el paso de lisis de eritrocitos que no es necesario. Finalmente, las PBMC se resuspendieron en 100 µl de PBS 1x y 200 µl de tampón *FACS Flow* a 4 °C y la fluorescencia fue analizada en el citómetro de flujo (*FACS Canto II*, BD Bioscience). La visualización de los resultados se realizó con el programa *BD FACS Diva* (BD Bioscience).

13.1.3. Análisis estadístico

Las diferencias de expresión de MSR1 entre los grupos estudiados y las distintas poblaciones celulares, se analizaron con el test de T de Student no pareado, utilizando el programa *GraphPad InStat 3*. Se comparó la expresión global de este biomarcador en la sangre y en las PBMC de los cuatro fenotipos clínicos y de los subgrupos de gravedad, además de analizar MSR1 en las distintas poblaciones de células caracterizadas.

13.2. Análisis de expresión por microscopía confocal

Otra aproximación utilizada para demostrar la presencia de la proteína MSR1 en poblaciones celulares procedentes de sangre periférica es la microscopía confocal, que permite la visualización de su presencia en la membrana de los distintos tipos celulares analizados de PBMC. En este tipo de microscopía, la fuente de luz es un láser que ilumina la muestra a diferentes alturas, generando secciones ópticas. Uno de sus componentes esenciales es el *pinhole* o fuente de iluminación puntual, que filtra la luz proveniente de planos fuera de foco, incrementando así el contraste. El *pinhole* es una apertura localizada delante del detector fotomultiplicador que evita el paso de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en foco. El láser emitido se refleja en un espejo dicróico y escanea la muestra en el plano de foco, provocando la emisión de fluorescencia por el fluorocromo, que emite fotones en el mismo plano focal. Los fotones emitidos por el fluorocromo atraviesan el espejo dicróico y llegan al detector tras pasar por el *pinhole*. Las emisiones de fluorescencia que se dan en puntos por encima y por debajo del plano de foco, no son confocales con el *pinhole* y, por lo tanto, son bloqueados por este. La luz ingresa en un fotomultiplicador que la convierte en una señal eléctrica. La imagen se construye por el barrido sincronizado de la fuente y el detector. El protocolo de marcaje es el mismo que el descrito anteriormente en el apartado 13.1.2. de Materiales y Métodos. En el último paso, las células se resuspendieron en 400 μ l de PBS 1x y se colocaron en una placa de microscopía de 8 pocillos (Ibidi, Martinsried, Alemania) donde se encuentran en suspensión. La visualización del marcaje por fluorescencia se realizó con un microscopio confocal *Leica SP5* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de inmersión en aceite (40X) usando el programa *LAS AF* de Leica Microsystems.

RESULTADOS

1. POBLACIONES DE ESTUDIO

Este estudio constó de dos poblaciones diferentes, definidas en el Apartado 1 de Materiales y Métodos. La Tabla 9 resume las características demográficas y clínicas de la población de estudio 1 o P1.

Tabla 9: Características demográficas y clínicas de la población de estudio 1

	N	Sexo	Edad	Tabaquismo	Diagnóstico clínico		IgE Total	% FVC	% FEV ₁
Sujetos sanos control (C)	30	67,86% M 32,14% H	45,66 ± 12,39	92,86% NF 7,14% F 0% EF	Sin síntomas asmáticos ni alérgicos		75,02 ± 128,21	-	-
Sujetos asmáticos no alérgicos (ANA)	30	73,33% M 26,67% H	58,03 ± 13,14*	73,33% NF 10% F 16,67% EF	50% AG 30% AM 20% AL	Sin síntomas alérgicos	82,04 ± 80,63	81,11 ± 22,69	75,18 ± 22,82
Sujetos asmáticos alérgicos (AA)	30	80% M 20% H	42,37 ± 15,44#	68,97% NF 6,90% F 24,14% EF	50% AG 26,7% AM 23,3% AL	43,3% A 56,7% NA	371,64 ± 437,69*#	75,53 ± 16,58	73,33 ± 16,28
Sujetos alérgicos no asmáticos riníticos (AR)	14	38,46% M 61,54% H	34 ± 8,86*#	85,71% NF 14,29% F 0% EF	Sin síntomas asmáticos	100% A	250,65 ± 249,07*#	-	-

*Comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo control y el grupo de pacientes seleccionado. #Comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo asma no alérgica y el grupo seleccionado. M: mujeres. H: hombres. NF: no fumadores. F: fumadores. EF: ex-fumadores. AG: asma grave. AM: asma moderada. AL: asma leve. A: alérgico a pólenes. NA: no alérgico a pólenes. % FVE₁: porcentaje del volumen vital forzado en un segundo. % FVC: porcentaje predictivo de la capacidad vital forzada.

La Tabla 10 resume las características demográficas y clínicas de la población de estudio 2 o P2.

Tabla 10: Características demográficas y clínicas de la población de estudio 2

	N	Sexo	Edad	Tabaquismo	Diagnóstico clínico		% FVC	% FEV ₁
Sujetos sanos control (C)	11	81,82% M 18,18% H	49,10 ± 14,48*	90,91% NF 9,09% F 0% EF	Sin síntomas asmáticos ni alérgicos		-	-
Sujetos asmáticos no alérgicos (ANA)	11	81,82% M 18,18% H	56,18 ± 16,79*	63,64% NF 9,09% F 27,27% EF	45,46% AG 54,54% AML	Sin síntomas alérgicos	98,07 ± 14,43	86,64 ± 23,03*
Sujetos asmáticos alérgicos (AA)	13	92,31% M 7,69% H	41,23 ± 13,53#†	76,92% NF 15,39% F 7,69% EF	53,85% AG 46,15% AML	92,31% A 7,69% NA	91,35 ± 24,81	75,85 ± 24,27*
Sujetos con EPOC	11	100% H	70,36 ± 7,93	9,09% NF 9,09% F 81,82% EF	54,55% EG 27,27% EM 18,18% EL	9,09% A 90,91% NA	76,25 ± 31,82	52 ± 22,10

*Comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo con EPOC y el grupo de pacientes seleccionado. †Comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo asma no alérgico y el grupo seleccionado. #Comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre el grupo con EPOC y el grupo seleccionado. M: mujeres. H: hombres. NF: no fumadores. F: fumadores. EF: ex-fumadores. AG: asma grave. AM: asma moderada. AL: asma leve. EG: EPOC grave. EM: EPOC moderada. EL: EPOC leve. A: alérgico al polen. NA: no alérgico al polen. % FVE₁: porcentaje del volumen vital forzado en un segundo. % FVC: porcentaje predictivo de la capacidad vital forzada.

1.1. Características demográficas

Como resume la Tabla 9 la edad media entre los grupos de estudio de P1 fue heterogénea, siendo los sujetos ANA significativamente mayores que el resto de grupos. Los sujetos AR fueron los más jóvenes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a los grupos de sujetos C y de pacientes con ANA. Todos los grupos tuvieron un porcentaje mayor de mujeres que de hombres excepto el grupo AR, donde un 38,46 % fueron del sexo femenino y un 61,54 % del masculino.

En la población P2 (Tabla 10), los sujetos con EPOC fueron los más mayores, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de grupos. Además, se observaron diferencias significativas entre los pacientes con asma, siendo los sujetos con asma alérgica más jóvenes. Acorde al sexo, en todos los grupos estudiados más del 80 % fueron mujeres, excepto en EPOC que todos fueron hombres.

1.2. Características clínicas

La proporción de sujetos fumadores en P1 fue similar en todos los grupos. Además, en la tabla 9 se indica la distribución de los pacientes asmáticos en función de su gravedad, que en la mitad de los casos mostraron un diagnóstico de asma grave, mientras que la otra, de asma moderada-leve.

El grupo ANA no padecía de síntomas alérgicos, ni mostraba pruebas cutáneas positivas a ningún alérgeno de la batería de alérgenos comunes utilizada, según se detalla en el apartado 1.1.2 de Materiales y Métodos. En el caso de los sujetos con AA de la población P1, aproximadamente la mitad (un 43,3 %) eran alérgicos a pólenes (el 16,67 % solo a pólenes, el 13,33 % a pólenes, ácaros del polvo y epitelio animal, el 6,67 % a pólenes y ácaros del polvo, el 3,33 % a pólenes, ácaros del polvo, epitelio animal y moho, y el 3,33 % a pólenes, ácaros del polvo y moho). Del resto, el 53,33 %, eran alérgicos a ácaros del polvo y a epitelio animal y un 3,33 % a ácaros del polvo solo. En el grupo en el que los pacientes solo padecían alergia, los aeroalérgenos fueron los predominantes (el 85,72 % eran alérgicos a pólenes, el 7,14 % a pólenes, ácaros del polvo y epitelio animal, y el 7,14 % a pólenes y melocotón). El 100% eran alérgicos a algún polen.

Enfermedades concomitantes del grupo ANA (datos que no se muestran en la tabla) fueron: rinitis (80%), sinusitis (50 %), poliposis nasal (43,30 %), reflujo esofágico (20%), pirosis (13,33 %), cardiopatías (10 %), eccema (6,67 %), urticaria (6,67 %), regurgitaciones (3,33 %), disfagia (3,33 %), hipertiroidismo (3,33 %), e hipotiroidismo (3,33 %).

Entre las enfermedades concomitantes que padecían los pacientes con AA hubo un 90 % con rinitis, un 50 % con reflujo esofágico, un 43,33 % con pirosis, un 26,67 % con sinusitis, un 16,67 % con urticaria, un 10 % con poliposis nasal, 10 % regurgitaciones, un 3,33 % con cardiopatías, un 3,33 % con eccema y un 3,33 % con hipotiroidismo. El 100 % de los pacientes AR padecían rinitis.

El porcentaje y número de eosinófilos en el grupo ANA fue normal ($3,83 \pm 2,24$ % y $273,86 \pm 137,13$ eosinófilos/ μ l, respectivamente) (Límites de normalidad: 1–4 % y 50 - 450 eosinófilos por microlitro). No hubo diferencias significativas en la presencia de eosinófilos entre los sujetos con ANA grave y ANA moderada-leve (porcentaje: $3,73 \pm 2,48$ vs. $4,22 \pm 1,25$ %, respectivamente; número: $264 \pm 152,96$ vs. $310 \pm 52,57$ eosinófilos/ μ l, respectivamente). Por otro lado, la presencia de eosinófilos fue alta en los pacientes AA que mostraron un porcentaje de $5,70 \pm 3,40$ % y un número de $625,60 \pm 999,28$ eosinófilos/ μ l. Entre los pacientes con AA grave y moderada-leve se observó un incremento de eosinófilos en los pacientes graves (porcentaje: $5,89 \pm 3,70$ vs. $5,28 \pm 2,85$ %, número: $739,50 \pm 1180,74$ vs. $359,83 \pm 220,55$ eosinófilos/ μ l, AA grave vs. AA moderada-leve, respectivamente), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (estos datos no se muestran en la tabla).

En la Tabla 9 también se incluye el valor de IgE total en suero. Se puede observar que la media de los niveles de IgE total está aumentada significativamente en los dos grupos de pacientes con alergia comparada con el resto de grupos. Además se incluyen como parámetros pulmonares funcionales, los porcentajes FVC y FVE₁, cuyos valores menores del 80 % suponen un indicativo de enfermedad asmática. Como se observa, los valores de estos parámetros fueron similares entre los dos grupos de pacientes con asma estudiados, aunque si se analizan considerando la gravedad de la enfermedad hay diferencias significativas solo dentro del grupo con ANA entre los pacientes graves y los de diagnóstico moderado y leve (% FEV₁: $66,33 \pm 16,62$ vs. $85,38 \pm 21,03$, $p=0,0127$; % FVC: $69,93 \pm 19,94$ vs. $94 \pm 19,52$, $p=0,0031$, respectivamente).

En la población P2 (Tabla 10), se observó que en relación al hábito tabáquico, los sujetos C y los grupos con asma tenían una distribución similar, mientras que la mayoría de los sujetos con EPOC fueron exfumadores. En esta población también se seleccionaron los grupos de pacientes acorde a la gravedad, mostrando la mitad un diagnóstico grave (de asma o de EPOC) y la otra mitad, moderado-leve.

Un 92, 31 % de los pacientes con asma alérgica eran alérgicos a algún polen (de los cuales un 46,15 % eran además alérgicos al epitelio animal, un 15,39 % también al epitelio animal y a los ácaros del polvo, un 7,69 % al epitelio animal y moho, un 7,69 % al epitelio animal y kiwi, un 7,69

% al moho y champiñón y un 7,69 % al epitelio animal, ácaros del polvo, moho y alimentos) y un 7,69 % solo era alérgico al epitelio animal. Entre los sujetos con EPOC, un 9,09 % eran alérgicos al polen y epitelio animal.

De los pacientes con ANA un 36,36 % padecían además de poliposis nasal, un 27,27 % de rinitis no alérgica, un 9,09 % de sinusitis, un 9,09 % de cardiopatía, y un 9,09 % de hipotiroidismo. En los pacientes con AA las enfermedades concomitantes se distribuyeron de esta forma: 30,77 % con rinitis, 7,69 % con poliposis nasal, 15,39 % reflujo esofágico, 7,69 % esofagitis eosinofílica, 7,69 % bocio y 7,69 % colitis ulcerosa. En los pacientes con EPOC, un 27,27 % además sufría de insuficiencia respiratoria crónica y un 9,09 % de rinitis.

Por otro lado, P2 muestra valores significativamente más altos en el porcentaje de FEV_1 en los grupos con asma cuando se compararon con el grupo con EPOC. Cuando se analizó la gravedad de la enfermedad entre los grupos de los pacientes, se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de función pulmonar en el grupo con AA (% FEV_1 AA grave: $60,03 \pm 19,70$ vs. moderada-leve: $94,32 \pm 13,73$, $p=0,0044$; % FVC AA grave: $73,39 \pm 18,43$ vs. moderada-leve: $112,32 \pm 9,51$, $p=0,0007$). En el grupo de sujetos con EPOC también se obtuvieron diferencias en el % FEV_1 (grave: $34,75 \pm 11,41$ vs. moderada-leve: $65,80 \pm 18,54$, $p=0,0225$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con ANA, pero sí que hubo una tendencia a que los pacientes con ANA moderada-leve mostraran valores mayores en los parámetros de función pulmonar (% FEV_1 ANA grave: $75,50 \pm 24,58$, ANA moderada-leve: $94,07 \pm 20,65$; % FVC ANA grave: $93,25 \pm 15,84$, ANA moderada-leve: $101,28 \pm 13,90$).

2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA

2.1. Selección de genes de estudio

Basándonos en los criterios establecidos en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos, se seleccionaron 94 genes (Tabla 11) con los que se diseñó un estudio de expresión génica en tarjetas microfluídicas de 384 pocillos, incluyendo además, dos controles endógenos (*18S* y *GADPH*).

Tabla 11: Listado de los 94 genes seleccionados

SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE COMPLETO	CRITERIO DE SELECCIÓN	DETECTOR
ADAM33	Metalopectidasa ADAM, dominio 33	3	ADAM33-Hs00905552_m1
ADRB1	Receptor adrenérgico beta 1	2	ADRB1-Hs02330048_s1
AKT1	Quinasa serín/treonina AKT 1	2	AKT1-Hs00178289_m1
ALOX15	Araquidonato 15-lipoxigenasa	1	ALOX15-Hs00993765_g1
ALOX5	Araquidonato 5-lipoxigenasa	2	ALOX5-Hs01095330_m1
APAF1	Factor apoptótico 1 activador de peptidasa	2	APAF1-Hs00559441_m1
BAX	Proteína X asociada a BCL2	2	BAX-Hs00180269_m1
C3AR1	Receptor 1 para componente del complemento 3a	2	C3AR1-Hs00269693
CCL5	Ligando 5 de quimiocinas (motivo C-C)	3	CCL5-Hs00982282_m1
CCL11	Ligando 11 de quimiocinas (motivo C-C)	3	CCL11-Hs00237013_m1
CCL17	Ligando 17 de quimiocinas (motivo C-C)	3	CCL17-Hs00171074_m1
CD40	Molécula CD40, Receptor para la superfamilia TNF miembro 5	2	CD40-Hs01002913_g1
CD48	Molécula CD48	2	CD48-Hs00914738_m1
CD86	Molécula CD86	2	CD86-Hs01567026_m1
CHI3L1	Quitinasa 3 similar a la 1 (glicoproteína-39 del cartilago)	1	CHI3L1-Hs00609691_m1
CLCA1	Accesorio 1 del canal de cloruro	1	CLCA1-Hs00976287_m1
CPA3	Carboxypeptidasa A3 (mastocito)	1	CPA3-Hs00157019_m1
CRTAP	Proteína asociada al cartilago	2	CRTAP-Hs00197261_m1
CTSC	Catepsina C	1	CTSC-Hs00175188_m1
CTSG	Catepsina G	1	CTSG-Hs01113415_g1
CX3CR1	Receptor 1 para quimiocina (motive C-X3-C)	1	CX3CR1-Hs01922583_s1
DUSP1	Fosfatasa 1 con especificidad dual	1	DUSP1-Hs00610256_g1
EIF5A	Factor 5A de iniciación de la translación eucariota	1	EIF5A-Hs00744729_s1
FOXP3	Factor <i>forkhead</i> de transcripción P3	3	FOXP3-Hs01085834_m1
FPR3	Receptor 3 para formil-péptidos	2	FPR3-Hs00266666_s1
GADD45B	Proteína beta inducible en condiciones de paro en el crecimiento y de daño en el ADN	1	GADD45B-Hs04188837_g1
GPX3	Glutationperoxidasa 3 (plasma)	1	GPX3-Hs01078668_m1
GZMH	Granzima H (Proteína h-CCPX, similar a la catepsina G- 2)	2	GZMH-Hs00277212_m1
HLA-DQB1	Complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DQ beta 1	1, 2	HLA-DQB1-Hs03054971_m1
HLA-DRB1	Complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DR beta 1	2	HLA-DRB1-Hs99999917_m1
IFNG	Interferón, gamma	3	IFNG-Hs00989291_m1
IL-1R1	Receptor para interleucina 1, tipo I	1	IL-1R1-Hs00991002_m1
IL-1R2	Receptor para interleucina 1, tipo II	1	IL-1R2-Hs01030384_m1
IL-2	Interleucina 2	3	IL-2-Hs00174114_m1
IL-2RB	Receptor para interleucina2, beta	1	IL-2RB-Hs01081697_m1
IL-4	Interleucina 4	3	IL-4-Hs00174122_m1
IL-4R	Receptor para interleucina 4	3	IL-4R-Hs00166237_m1
IL-5	Interleucina 5	1	IL-5-Hs01548712_g1
IL-6	Interleucina 6 (interferón, beta 2)	1, 2	IL-6-Hs00985639_m1
IL-8	Interleucina 8	1	IL-8-Hs00174103_m1
IL-9	Interleucina 9	3	IL-9-Hs00914237_m1
IL-10	Interleucina 10	2	IL-10-Hs00961622_m1
IL-13	Interleucina 13	1	IL-13-Hs00174379_m1
IL-17	Interleucina 17 ^a	3	IL-17A-Hs00174383_m1
IL-25	Interleucina 25	3	IL-25-Hs03044841_m1
IL-33	Interleucina 33	1	IL-33-Hs00369211_m1

IRAK3	Quinasa 3 asociada al receptor para interleucina 1	3	IRAK3-Hs00936103_m1
ITGAL	Integrina, alfa L (antígeno CD11A (p180), antígeno 1 asociado a la función de linfocitos; polipéptido alfa)	2	ITGAL-Hs00158218_m1
ITGB7	Integrina, beta 7	2	ITGB7-Hs01565750_m1
ITGB8	Integrina, beta 8	2	ITGB8-Hs00174456_m1
LCK	Proteína tirosín-quinasa específica de linfocitos	2	LCK-Hs00178427_m1
LGALS3	Lectina de unión a galactosidasa, soluble, 3	3	LGALS3-Hs00173587_m1
LYN	Oncogén homólogo relacionado con v-yes-1 sarcoma viral de Yamaguchi	2	LYN-Hs00176719_m1
MAPK13	Proteína quinasa 13 activada por mitógenos	2	MAPK13-Hs00559623_m1
MSR1	Receptor <i>scavenger</i> 1 de macrófagos	2	MSR1-Hs00234007_m1
MUC2	Mucina 2, moco oligomérico/formador de gel	1	MUC2-Hs03005103_g1
MUC5AC	Mucina 5AC, moco oligomérico/formador de gel	1	MUC5AC-Hs00873651_Mh
MUC5B	Mucina 5B, moco oligomérico/formador de gel	1	MUC5B-Hs00861595_m1
NCF2	Factor citosólico 2 de neutrófilos	1	NCF2-Hs01084940_m1
NFATC1	Factor nuclear de linfocitos T activados, citoplasmático, dependiente de calcineurina1	2	NFATC1-Hs00542678_m1
NFKBIZ	Factor nuclear del inhibidor de linfocitos B del gen potenciador del polipéptido de cadena ligera kappa, zeta	1	NFKBIZ-Hs00230071_m1
NLRP3	Familia NLR, dominio que contiene pirina 3	2	NLRP3-Hs00918082_m1
NOS2A	Sintasa 2 de óxido nítrico, inducible	1	NOS2-Hs01075529_m1
ORMDL3	Similar a ORM1- 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	1	ORMDL3-Hs00918021_m1
PHLDA1	Miembro 1 de la familia A con homología al dominio de <i>plesktrin</i>	1	PHLDA1-Hs00705810_s1
PI3	Inhibidor de peptidasa 3, derivado de piel	1	PI3-Hs00160066_m1
POSTN	Periostina, factor específico de osteoblastos	1	POSTN-Hs01566734_m1
PRKACA	Proteína quinasa, dependiente de AMPc, subunidad catalítica, alfa	2	PRKACA-Hs00427274_m1
PRKACB	Proteína quinasa, dependiente de AMPc, subunidad catalítica, beta	2	PRKACB-Hs01086757_m1
PTGER2	Receptor 2 para prostaglandina E (subtipo EP2), 53 kDa	2	PTGER2-Hs04183523_m1
PTPRC	Proteína tirosín-fosfatasa, receptor tipo C	3	PTPRC-Hs04189704_m1
RNASE3	Ribonucleasa, familia RNasa A, 3	3	RNASE3-Hs01923184_s1
S100A9	Proteína A9 de unión a calcio S100	1	S100A9-Hs00610058_m1
S1PR5	Receptor 5 para fosfatasa de esfingosina-1	2	S1PR5-Hs00928195_s1
SCD	Esteroil-coenzima Adesaturasa (desaturasa delta-9)	1	SCD-Hs01682761_m1
SELL	Selectina L	2	SELL-Hs00174151_m1
SERPINB2	Inhibidor de la serpin peptidasa, subtipo B (ovalbumina), miembro 2	1, 2	SERPINB2-Hs01010736_m1
SERPINB4	Inhibidor de la serpin peptidasa, subtipo B (ovalbumina), miembro 4	1	SERPINB4-Hs01691258_g1
SMURF1	Proteína ubiquitinligasa 1, específica de SMAD E3	2	SMURF1-Hs00905759_m1
SOS1	Homólogo 1 a <i>son of sevenless</i> (<i>Drosophila</i>)	2	SOS1-Hs00362308_m1
SPN	Sialoforina	2	SPN-Hs01872322_s1
SPP1	Fosfoproteína 1 secretada	3	SPP1-Hs00959010_m1
STAT1	Activador de transcripción y transductor de señal, 1,91kDa	3	STAT1-Hs01013996_m1
SVIL	<i>Supervillin</i>	1	SVIL-Hs00931028_m1
TAGAP	Proteína activadora de linfocitos T activadas por RhoGTPasa	2	TAGAP-Hs00299284_m1
TCF21	Factor de transcripción 21	1	TCF21-Hs00162646_m1
TGFB1	Factor de crecimiento transformador, beta 1	2	TGFB1-Hs00998133_m1
TLR4	Receptor 4 tipo <i>toll</i>	2	TLR4-Hs00152939_m1

TNF	Factor de necrosis tumoral	3	TNF-Hs01113624_g1
TNFAIP3	Factor de necrosis tumoral, proteína 3, inducida por alfa	1	TNFAIP3-Hs00234713_m1
TRIM37	Motivo 37 que contiene tripartito	2	TRIM37-Hs00248701_m1
TSLP	Linfopoyetina del estroma del timo	1	TSLP-Hs00263639_m1
VCAN	Versican	2	VCAN-Hs00171642_m1
ZAP70	Proteína quinasa asociada a la cadena zeta (TCR), 70kDa	2	ZAP70-Hs00896347_m1

Criterios de selección: 1. Genes relevantes por expresión diferencial y por estudios de polimorfismos genéticos en relación al asma y la alergia, obtenidos en más de un trabajo independiente tras una búsqueda bibliográfica; 2. Genes con expresión diferencial obtenidos de resultados de trabajos anteriores de nuestro laboratorio; 3. Genes candidatos de interés implicados en procesos de plasticidad celular, inflamación y/o regulación que podrían haber quedado excluidos por criterios anteriores. El detector indica las sondas específicas de cada gen utilizadas para realizar la qRT-PCR.

2.2. Análisis de la expresión génica por PCA

El estudio de expresión génica de los 96 genes se realizó en 52 tarjetas microfluídicas, en las 104 muestras por duplicado de ARN extraído según el Apartado 5 de Materiales y Métodos, y siguiendo el protocolo de qRT-PCR descrito en el Apartado 8.2 de Materiales y Métodos. Las medias de concentración de ARN por grupo clínico fueron en el grupo C de $111,83 \pm 57,18$ ng/ μ l, en el grupo ANA de $109,76 \pm 71,58$ ng/ μ l, en el grupo AA de $164,52 \pm 87,99$ ng/ μ l, y en el grupo AR de $105,55 \pm 25,73$ ng/ μ l.

Después de la normalización de los resultados obtenidos de la qRT-PCR, se realizó un estudio preliminar de los datos de expresión por un análisis de componentes principales o PCA (*Principal Component Assay*). El resultado de este análisis no supervisado se muestra en la Figura 4, donde se comprueba cómo la expresión de estos 94 genes separa perfectamente a los sujetos en cuatro agrupamientos (o *clusters*) que coinciden con los cuatro grupos clínicos de nuestra población. Esto confirma la buena selección de los genes estudiados y alienta a encontrar biomarcadores específicos de cada fenotipo clínico en este tipo de muestras.

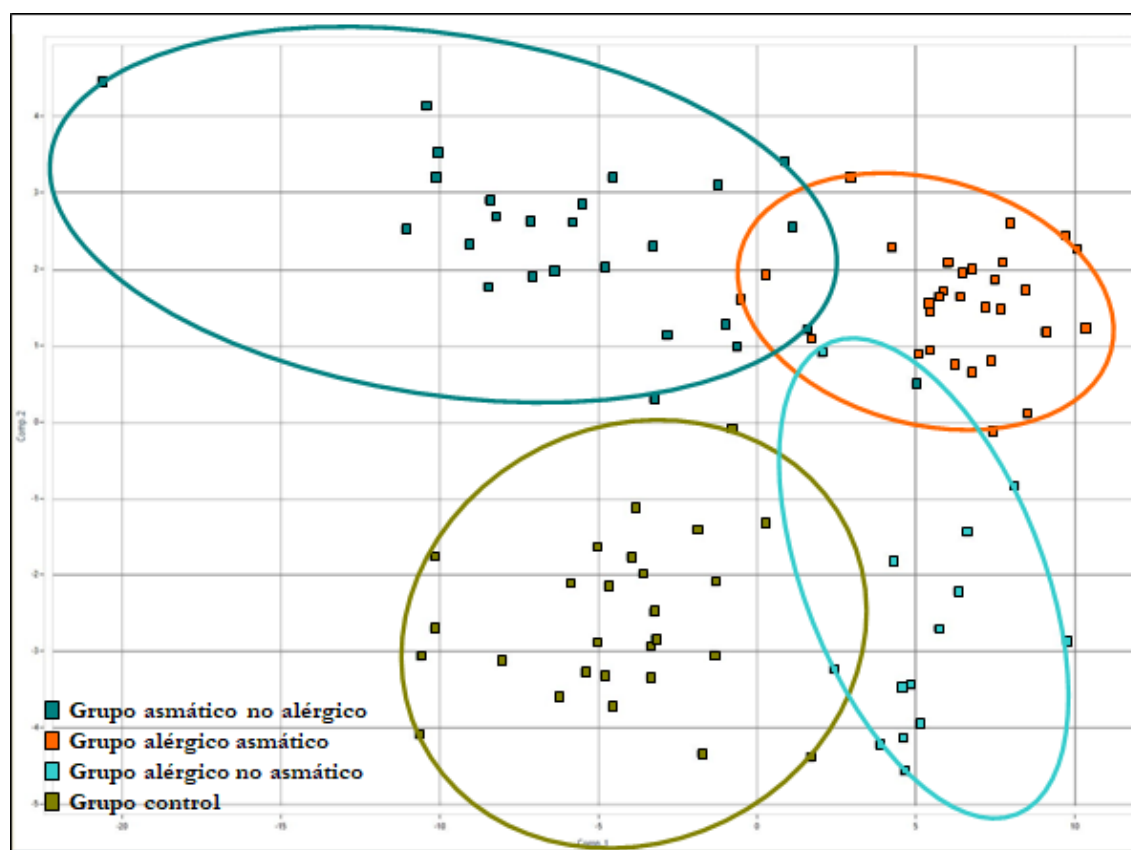


Figura 4: Análisis por PCA de la expresión génica global de la población de estudio 1. En la figura se indican cuatro grupos con expresión génica diferencial detectados, cuyo agrupamiento coincide con los 4 fenotipos clínicos de la población.

2.3. Análisis de expresión génica por *Heatmaps*

El siguiente paso fue el análisis de expresión génica dos a dos, de los cuatro grupos de estudio, mediante un modelo jerárquico no supervisado, con el fin de obtener los *Heatmaps* que permiten categorizar las muestras de estudio en un grupo u otro y de este modo, definir la sensibilidad y especificidad de los genes estudiados para diferenciar muestras de diferentes grupos clínicos. Este modelo pudo agrupar las muestras dependiendo de su expresión génica con una especificidad y sensibilidad del 100% para los sujetos ANA y AA al compararlos con los controles, es decir, la expresión de estos 94 genes es muy similar en todos los sujetos de un grupo clínico y muy distinta de los sujetos C (Figura 5A y B). La sensibilidad y especificidad fue algo menor para discriminar las muestras AR de las de sujetos control, 92,86 y 96,30 % respectivamente (Figura 5C). Las muestras de los dos grupos con asma al compararlas con las muestras de AR se agruparon con una sensibilidad del 78,57%, siendo la especificidad del 88,40% en el caso de AA y del 90% para ANA. Las muestras más difíciles de diferenciar según la expresión total de estos 94 genes, fueron las de los sujetos ANA de las de AA, con una sensibilidad del 66,60% y una especificidad del 61,50%.

A) Heatmap del grupo ANA comparado con C



B) Heatmap del grupo AA comparado con C



C) Heatmap del grupo AR comparado con C

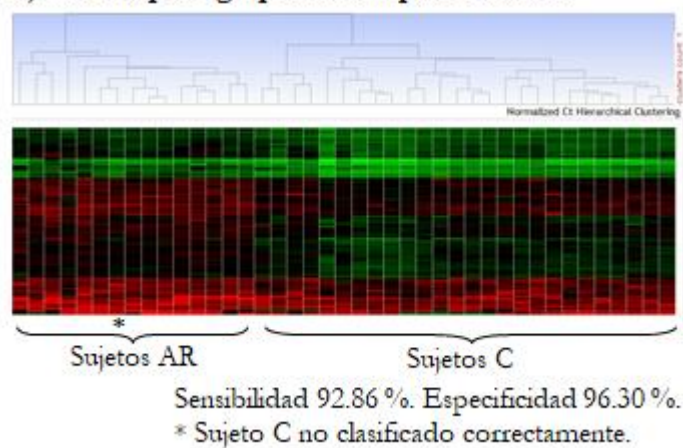


Figura 5: *Heatmaps* de los 94 genes. Agrupación de las muestras en relación a la expresión de los 94 genes analizados. Comparación de fenotipos clínicos vs. control.

2.4. Expresión génica diferencial entre fenotipos clínicos

Con el fin de definir los perfiles génicos específicos de cada condición clínica, se elaboraron varios tipos de análisis estadísticos (detallados en el apartado 8.3.3 de Materiales y Métodos). En primer lugar, se realizaron comparaciones de la expresión génica de los tres grupos clínicos con enfermedades respiratorias de P1 respecto al grupo de sujetos C. Durante el análisis, 10 genes (*CLCA1*, *IL-17A*, *IL-25*, *IL-33*, *IL-5*, *IL-9*, *MUC5AC*, *POSTN*, *SERPINB4* y *TCF21*) se consideraron indeterminados para todas las muestras y no se pudieron incluir en el estudio. Otros 10 (*ADAM33*, *CCL17*, *IL-13*, *MUC5B*, *MUC2*, *NOS2*, *TSLP*, *CCL11*, *DRB1* e *IL-4*) solo se detectaron en una de las condiciones o los datos no tuvieron consistencia, por lo que tampoco pudieron ser examinados. Setenta y dos genes (76,60 % del total de los genes seleccionados (n=94) o 97,20 % de los 74 genes que finalmente pudieron ser analizados) se consideraron diferenciales entre el grupo C y al menos una de las condiciones clínicas estudiadas. Analizando por grupos y comparado con el grupo de sujetos C, los sujetos con alergia (AA y AR) mostraron más genes diferenciales estadísticamente significativos que los sujetos del grupo ANA. El número de genes con una expresión diferencial estadísticamente significativa respecto al grupo C (Tabla 12A) fue de 26 genes (16 sobreexpresados y 10 reprimidos) en el grupo ANA, 69 (1 sobreexpresado, *MSR1*, y 68 reprimidos) en el grupo AA y 66 (todos reprimidos) en el grupo AR. Del total de genes diferencialmente expresados en las condiciones clínicas comparadas con el grupo sano, 22 fueron comunes en los tres grupos clínicos, 42 comunes para los dos grupos con sujetos alérgicos y uno (*MSR1*) fue común en los dos grupos con asma (alérgica y no alérgica). Por otro lado, *SERPINB2* solo mostró un incremento estadísticamente significativo en el grupo ANA. Por el contrario, *ADRB1*, *ALOX15*, *CTSG* y *CX3CR1* mostraron una menor expresión estadísticamente significativa solo en el grupo AA. Ninguno de los genes analizados se expresó diferencialmente solo en el grupo AR.

Después de realizar las comparaciones con el grupo control y con el fin de encontrar genes específicos del asma y/o la alergia, se examinaron las diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica entre los tres grupos clínicos. Los resultados se resumen en la Tabla 12B. La comparación entre sujetos ANA y AA mostró 74 genes sobreexpresados en el grupo ANA, siendo los más diferenciales ($RQ > 10$) 5, *CCL5*, *CHI3L1*, *CTSG*, *GZMH* e *IL-1R2*. La comparación entre el grupo ANA y AR reveló 66 genes diferencialmente expresados, de los que 64 estaban sobreexpresados en el grupo con los pacientes asmáticos y solo dos reprimidos, *CHI3L1* y *PI3*. Estableciendo un criterio más estricto ($RQ > 10$), se seleccionaron los 11 genes con mayor diferencia en su expresión, 10 sobreexpresados en los sujetos asmáticos, *CCL5*, *CRTAP*, *GPX3*, *HLA-DQB1*, *IL-10*, *IL-2RB*, *MSR1*, *NLRP3*, *PHLDA1* y *SERPINB2*, y *PI3*

como único gen reprimido. Finalmente, la comparación entre sujetos AA y AR mostró que 14 genes tenían una expresión diferente, 4 de ellos con una expresión mayor (*IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1* y *SERPINB2*) y 10 genes reprimidos (*ALOX15*, *CHI3L1*, *CPA3*, *CTSG*, *IL-1R2*, *IL-8*, *NFKB1Z*, *PI3*, *SVIL* y *TNF*) en sujetos AA. Al aplicar un criterio más estricto ($RQ > 10$), se redujeron a 4 genes, muy reprimidos en sujetos asmáticos: *CHI3L1*, *CPA3*, *CTSG* y *PI3*.

Tabla 12: Análisis de genes diferenciales

A. Genes diferenciales entre grupo clínico y grupo control

Comparación	Número de genes con expresión diferencial*	
ANA vs. C	26	16 sobreexpresados 10 reprimidos
AA vs. C	69	1 sobreexpresado 69 reprimidos
AR vs. C	66	Todos reprimidos

B. Genes diferenciales entre grupos clínicos

Comparación	Número de genes con expresión diferencial*	Número de genes sobreexpresados	Número de genes reprimidos	Genes con expresión diferencial* y con un valor $RQ > 10$
ANA vs. AA	74	74 en ANA	-	<i>CCL5</i> , <i>CHI3L1</i> , <i>CTSG</i> , <i>GZMH</i> , <i>IL-1R2</i>
ANA vs. AR	66	64 en ANA	2 en ANA	<i>CCL5</i> , <i>CRTAP</i> , <i>GPX3</i> , <i>HLA-DQB1</i> , <i>IL-10</i> , <i>IL-2RB</i> , <i>MSR1</i> , <i>NLRP3</i> , <i>PHLDA1</i> , <i>SERPINB2</i> , <i>PI3</i>
AA vs. AR	14	4 en AA	10 en AA	<i>CHI3L1</i> , <i>CPA3</i> , <i>CTSG</i> , <i>PI3</i>

* p ajustada $< 0,05$ y $RQ < -2$ o > 2 . Todos los genes de la quinta columna están sobreexpresados menos los marcados en negrita que están reprimidos. RQ: cuantificación relativa.

2.5. Expresión génica diferencial dependiendo de la gravedad asmática

Los dos grupos con sujetos asmáticos (alérgicos y no alérgicos) estaban compuestos por un 50 % de pacientes con asma grave y otro 50 % de pacientes con asma moderada-leve. Por esta razón, se decidió analizar la relación entre la gravedad y la expresión génica. Para ello se aplicó un criterio de selección más estricto de $RQ > 4$ o $< 0,25$ como ya se comenta en el Apartado de Materiales y Métodos 8.3.3.

En primer lugar, los dos subgrupos clasificados según la gravedad del asma (grave y moderado-leve) se compararon dentro de su mismo grupo clínico (asma no alérgica o asma alérgica) y después, la expresión génica de estos subgrupos por gravedad se comparó con el grupo C.

Ninguno de estos genes fue estadísticamente significativo con el criterio establecido (ver apartado 8.3 de Materiales y Métodos). Sin embargo, las comparaciones con el grupo C revelaron datos muy interesantes (Tabla 13). Cuatro genes (*IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1* y *SERPINB2*) se encontraron sobreexpresados y 5 (*CHI3L1*, *CPA3*, *IL-8*, *IL-1R2* y *PI3*) tuvieron una menor expresión en los pacientes con ANA grave al compararlos con los sujetos C. Treinta y cinco genes estaban reprimidos en pacientes AA respecto a los sujetos C (Tabla 13A y B). Cinco de estos genes eran los mismos que se encontraron muy reprimidos en los pacientes ANA graves (*CHI3L1*, *CPA3*, *IL-1R2*, *IL-8*, *PI3*). Por otro lado, *MSR1* y *SERPINB2* (significativos en el grupo ANA) fueron los únicos genes con sobreexpresión estadísticamente significativa en pacientes AA, pero este aumento no superó el criterio establecido de $RQ > 4$. *MSR1* fue solo significativo en el grupo AA total ($RQ = 2,81$) y en pacientes con AA moderada-leve ($RQ = 3,30$) y *SERPINB2* solo en pacientes con AA grave ($RQ = 2,76$). En la Tabla 13C, se muestran los resultados de los 37 genes diferenciales del grupo AR que cumplen el criterio de $RQ < 0,25$ y se resaltan los que son comunes con el grupo ANA.

Tabla 13: Genes diferencialmente expresados en los fenotipos clínicos respecto al grupo control

A)		Asma no alérgica vs. Control		Asma no alérgica grave vs. Control		Asma no alérgica moderada-leve vs. Control	
Gen	Expresión	RQ	<i>P</i> ajustada	RQ	<i>P</i> ajustada	RQ	<i>P</i> ajustada
<i>IL-10</i>	Aumentada	6,142	1,62E-06	7,865	1,07E-06	4,796	1,74E-03
<i>MSR1</i>	Aumentada	12,891	1,44E-06	25,719	4,66E-07	6,461	3,41E-03
<i>PHLDA1</i>	Aumentada	6,899	1,86E-06	10,531	1,38E-07	4,520	1,72E-03
<i>SERPINB2</i>	Aumentada	8,948	7,61E-05	10,929	5,53E-04	7,326	3,46E-03
<i>CHI3L1</i>	Disminuida	0,027	3,20E-14	0,021	9,73E-12	0,034	2,39E-10
<i>CPA3</i>	Disminuida	0,222	1,07E-03	0,304	2,72E-02	0,162	2,61E-03
<i>IL-8</i>	Disminuida	0,128	3,22E-08	0,151	7,90E-05	0,108	1,37E-06
<i>IL-1R2</i>	Disminuida	0,221	7,61E-05	0,325	2,50E-03	0,149	2,71E-04
<i>PI3</i>	Disminuida	0,006	4,61E-16	0,005	4,79E-12	0,007	9,47E-12

B)		Asma alérgica vs. Control		Asma alérgica grave vs. Control		Asma alérgica moderada-leve vs. Control	
Gen	Expresión	RQ	<i>P</i> ajustada	RQ	<i>P</i> ajustada	RQ	<i>P</i> ajustada
<i>ALOX15</i>	Disminuida	0,050	4,00E-09	0,040	4,57E-07	0,064	1,49E-05
<i>ALOX5</i>	Disminuida	0,235	6,14E-08	0,226	1,81E-05	0,244	7,63E-06
<i>APAF1</i>	Disminuida	0,141	6,31E-13	0,150	9,65E-09	0,132	2,22E-09
<i>C3AR1</i>	Disminuida	0,162	8,65E-09	0,149	4,31E-06	0,175	7,03E-08
<i>CCL5</i>	Disminuida	0,141	3,18E-12	0,139	1,62E-08	0,144	5,51E-11
<i>CHI3L1</i>	Disminuida	0,003	6,18E-22	0,003	3,39E-17	0,002	1,01E-17
<i>CPA3</i>	Disminuida	0,028	8,47E-13	0,033	4,28E-09	0,023	8,20E-10
<i>CRTAP</i>	Disminuida	0,193	1,16E-13	0,208	3,48E-09	0,180	8,00E-12
<i>CTSG</i>	Disminuida	0,043	1,53E-10	0,040	4,88E-08	0,046	8,30E-08
<i>DUSP1</i>	Disminuida	0,127	9,91E-16	0,126	1,22E-10	0,127	1,79E-10
<i>GADD45B</i>	Disminuida	0,116	9,55E-17	0,118	3,71E-11	0,113	1,15E-11
<i>GZMH</i>	Disminuida	0,151	1,46E-12	0,131	4,87E-09	0,174	2,04E-09
<i>IFNG</i>	Disminuida	0,089	1,37E-12	0,086	1,43E-10	0,093	6,06E-09
<i>IL-1R2</i>	Disminuida	0,021	6,23E-18	0,030	4,28E-13	0,015	3,36E-14

<i>IL4R</i>	Disminuida	0,189	2,41E-13	0,189	1,34E-08	0,189	1,05E-10
<i>IL-8</i>	Disminuida	0,026	3,38E-19	0,031	5,72E-12	0,022	1,33E-14
<i>IRAK3</i>	Disminuida	0,220	2,79E-10	0,261	9,15E-07	0,190	7,13E-09
<i>LYN</i>	Disminuida	0,126	2,04E-18	0,135	4,51E-12	0,117	5,67E-13
<i>NCF2</i>	Disminuida	0,132	2,20E-11	0,135	2,45E-07	0,129	6,12E-10
<i>NFKBIZ</i>	Disminuida	0,106	6,98E-19	0,100	1,74E-13	0,112	4,05E-12
<i>PI3</i>	Disminuida	0,001	2,71E-24	0,001	7,17E-19	0,001	1,01E-17
<i>PRKACA</i>	Disminuida	0,202	4,23E-13	0,217	1,10E-08	0,188	2,49E-10
<i>PTPRC</i>	Disminuida	0,136	1,06E-09	0,104	2,37E-07	0,179	3,16E-07
<i>S100A9</i>	Disminuida	0,087	1,52E-15	0,085	1,22E-10	0,090	1,38E-11
<i>SCD</i>	Disminuida	0,224	2,04E-07	0,316	4,87E-04	0,159	6,96E-07
<i>SELL</i>	Disminuida	0,110	3,24E-15	0,088	5,26E-11	0,137	8,72E-11
<i>SOS1</i>	Disminuida	0,166	9,76E-10	0,198	8,84E-06	0,139	1,67E-07
<i>SPN</i>	Disminuida	0,191	1,30E-13	0,170	1,09E-09	0,214	5,77E-10
<i>STAT1</i>	Disminuida	0,147	7,39E-16	0,154	1,43E-10	0,141	5,51E-11
<i>SVIL</i>	Disminuida	0,079	7,83E-19	0,089	4,43E-13	0,069	8,21E-13
<i>TAGAP</i>	Disminuida	0,092	3,38E-19	0,110	4,62E-12	0,077	1,18E-14
<i>TGFB1</i>	Disminuida	0,181	4,71E-20	0,199	4,28E-13	0,164	1,18E-14
<i>TLR4</i>	Disminuida	0,087	1,16E-13	0,113	2,30E-08	0,068	1,38E-11
<i>TNF</i>	Disminuida	0,067	3,47E-21	0,069	1,52E-15	0,065	3,97E-14
<i>TNFAIP3</i>	Disminuida	0,100	2,80E-19	0,103	1,39E-13	0,098	5,96E-13

C)		Alergia sin asma vs. Control		Alergia sin asma vs. Control			
Gen	Expresión	RQ	P ajustada	Gen	Expresión	RQ	P ajustada
<i>C3AR1</i>	Disminuida	0,185	6,45E-07	<i>NLRP3</i>	Disminuida	0,235	2,96E-08
<i>CCL5</i>	Disminuida	0,135	2,80E-10	<i>PHLDA1</i>	Disminuida	0,234	8,75E-07
<i>CD48</i>	Disminuida	0,222	2,10E-09	<i>PI3</i>	Disminuida	0,101	2,05E-06
<i>CHI3L1</i>	Disminuida	0,141	4,27E-07	<i>PRKACA</i>	Disminuida	0,209	3,34E-09
<i>CRTAP</i>	Disminuida	0,125	2,92E-14	<i>PTPRC</i>	Disminuida	0,148	2,61E-06
<i>DUSP1</i>	Disminuida	0,207	2,05E-06	<i>S100A9</i>	Disminuida	0,153	8,89E-07
<i>GADD45B</i>	Disminuida	0,176	2,58E-07	<i>SCD</i>	Disminuida	0,217	1,05E-05
<i>GPX3</i>	Disminuida	0,205	1,29E-04	<i>SELL</i>	Disminuida	0,149	4,26E-08
<i>GZMH</i>	Disminuida	0,178	9,22E-08	<i>SPN</i>	Disminuida	0,206	7,63E-09
<i>IFNG</i>	Disminuida	0,171	2,38E-07	<i>SPP1</i>	Disminuida	0,228	1,39E-03
<i>IL-10</i>	Disminuida	0,152	5,07E-06	<i>SVIL</i>	Disminuida	0,157	3,38E-07
<i>IL-1R1</i>	Disminuida	0,218	5,07E-06	<i>TAGAP</i>	Disminuida	0,158	7,52E-10
<i>IL-1R2</i>	Disminuida	0,128	8,37E-08	<i>TGFB1</i>	Disminuida	0,203	3,53E-13
<i>IL-2RB</i>	Disminuida	0,217	3,80E-08	<i>TLR4</i>	Disminuida	0,091	7,37E-09
<i>IL-4R</i>	Disminuida	0,224	3,34E-09	<i>TNF</i>	Disminuida	0,135	3,58E-10
<i>IL-8</i>	Disminuida	0,176	7,81E-05	<i>TNFAIP3</i>	Disminuida	0,172	7,52E-10
<i>IRAK3</i>	Disminuida	0,246	2,27E-07	<i>TRIM37</i>	Disminuida	0,229	4,80E-09
<i>LYN</i>	Disminuida	0,215	1,40E-08	<i>VCAN</i>	Disminuida	0,207	3,34E-09
<i>NFATC1</i>	Disminuida	0,248	4,18E-08				1

A) Genes con expresión diferencial del grupo con asma no alérgica. B) Genes con expresión diferencial del grupo con asma alérgica. C) Genes con expresión diferencial del grupo con alergia no asmática. En los dos grupos con asma se añade la comparación de asma grave y asma moderada-leve. En negrita se resaltan en las Tablas B y C los genes comunes con el grupo con asma no alérgica (Tabla A). En la Tabla A y B se muestran los genes con una RQ (cuantificación relativa) mayor que 4 o menor que 0,25 en al menos dos de las comparaciones realizadas.

2.6. Análisis de funcionalidad e interacción proteica

Los análisis de funcionalidad de los genes diferenciales de cada condición clínica comparados con el grupo C se realizaron con el programa DAVID, que analiza el enriquecimiento de grupos de genes según las vías funcionales y los procesos biológicos. Los principales grupos de funcionalidad de cada condición clínica se muestran en las Tablas 14, 15 y 16, siendo el principal *cluster* el relacionado con la inflamación en la condición alérgica (con asma y sin asma) y el de componentes extracelulares en los pacientes con ANA. El valor de enriquecimiento (E.S.: *Enrichment score*) fue mayor en las condiciones alérgicas.

Tabla 14: Anotación de *clusters* funcionales de los 26 genes diferencialmente expresados entre el grupo ANA y C

REGIÓN EXTRACELULAR E.S: 3,73		CRATP, CHI3L1 , GPX3, IL-10 , IL-8 , LGALS3, MSR1 , PI3 , SERPINB2 , TNF, VCAN
MATRIZ EXTRACELULAR E.S: 2,64		CRTAP, CHI3L1 , LGALS3, PI3 , VCAN
SUPERFICIE CELULAR E.S: 2,31		CD86, IL-2RB, SELL, TLR4, TNF
PROCESOS INFLAMATORIOS E.S: 2,10	Activación celular	CD86, IL-10 , IL-8 , TNF, ZAP70, TLR4
	Respuesta inflamatoria	NLRP3, IL-10 , IL-8 , NFKBIZ, TLR4, TNF
	Espacio extracelular	CHI3L1 , GPX3, IL-10 , IL-8 , MSR1 , SERPINB2 , TNF
	Activación leucocitaria	CD86, IL-10 , IL-8 , ZAP70, TLR4
	Respuesta defensiva	NLRP3, IL-10 , IL-8 , NFKBIZ, TNF, TLR4
	Migración leucocitaria	IL-10 , IL-8 , TNF
	Interacción citocina-receptor para citocina	IL-1R2 , IL-10 , IL-2RB, IL-8 , TNF
PROCESOS INMUNITARIOS E.S: 1,94	Respuesta ante una herida	NLRP3, IL-10 , IL-8 , NFKBIZ, SERPINB2 , TNF, VCAN, TLR4
	Respuesta inmune	CD86, NLRP3, IL-1R2 , IL-10 , IL-8 , TNF, ZAP70, TLR4
	Regulación de producción de citocinas	CD86, NLRP3, IL-10 , TNF, TLR4
	Regulación de apoptosis	NLRP3, EIF5A, IL-10 , IL-2RB, PHLDA1 , SERPINB2 , TNF, TLR4
OTRAS		CPA3 , FPR3, NFATC1, PTGR2, SVIL

En negrita están resaltados los genes asociados con la gravedad del asma. E.S: *Enrichment score*.

Tabla 15: Anotación de *clusters* funcionales de los 69 genes diferencialmente expresados entre el grupo AA y C

PROCESOS INFLAMATORIOS E.S: 11,38	Repuesta defensiva	CD40, CD48, NLRP3, S100A9 , APAF1, ALOX15 , ALOX5 , CTSG, CCL5, CX3CR1, C3AR1, ITGAL, IFNG, IL-1R1, IL-8 , NCF2, NFKBIZ, PTPRC, RNASE3, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Respuesta inflamatoria	CD40, NLRP3, S100A9 , ALOX15 , ALOX5 , CCL5, C3AR1, ITGAL, IL-8 , NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Respuesta ante una herida	BAX, CD40, NLRP3, S100A9 , ALOX15 , ALOX5 , CCL5, CX3CR1, C3AR1, ITGAL, IL-8 , NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN, VCAN
	Regulación positiva de procesos de organismos multicelulares	BAX, CD40, NLRP3, ADRB1, ALOX5 , CCL5, IFNG, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1
REGULACIÓN POSITIVA DE PROCESOS METABÓLICOS DE MACROMOLECULAS E.S: 5,56		CD40, CD86, SMURF1, EIF5A, FOXP3, IFNG, IL-2, IL-2RB, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
REGULACIÓN POSITIVA DE PROCESOS DEL SISTEMA INMUNE E.S: 4,93		CD40, CD86, C3AR1, IFNG, IL-2, IL-4R , IRAK3, LCK, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, LYN, ZAP70
REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS E.S: 4,65		BAX, NLRP3, APAF1, DUSP1, EIF5A, IFNG, IL-2, IL-2RB, LCK, PTPRC, SPN, STAT1, SOS1, TLR4, TGFB1, TNF, TNFAIP3, AKT1
PROCESOS DE RESPUESTA E.S: 4,47	Respuesta a sustancias orgánicas	CD48, CTSC, CCL5, DUSP1, IFNG, IL-1R1, IRAK3, PRKACA, PRKACB, SPP1, SELL, STAT1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Respuesta a estímulos hormonales	CCL5, DUSP1, PRKACA, PRKACB, SPP1, STAT1, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Metabolismo fosfórico	DUSP1, GADD45B, IFNG, IRAK3, LCK, MAPK13, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TGFB1, TNF, AKT1, LYN, ZAP70
REGULACIÓN DE PROCESOS PROTÉICOS E.S: 4,34	Regulación de la producción de mediadores de la respuesta inmune	CD40, FOXP3, IFNG, IL-2, IRAK3, PTPRC, TGFB1, TNF
	Regulación de procesos de modificación proteica	BAX, SMURF1, FOXP3, IFNG, IL-2, PTPRC, TLR4, TGFB1, TNF, LYN
	Regulación de transporte proteico	BAX, NLRP3, IFNG, IL-2, PRKACA, TGFB1, TNF, AKT1
REGULACIÓN NEGATIVA DE RESPUESTA A ESTÍMULOS E.S: 3,32		FOXP3, IL-2, IRAK3, PTPRC, SPP1, SPN, TGFB1, AKT1
PROCESOS QUIMIOTÁCTICOS E.S: 3,22	Quimiotaxis	S100A9 , CCL5, CX3CR1, C3AR1, FPR3, IFNG, IL-8, SPN
	Migración leucocitaria	S100A9 , CCL5, IFNG, IL-8, TNF
	Quimiotaxis leucocitaria	S100A9 , CCL5, IFNG, IL-8
PROCESOS INMUNES E.S: 3,14	Activación leucocitaria	BAX, CD40, CD48, CD86, FOXP3, ITGAL, IL-2, IL-8 , LCK, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, LYN, ZAP70

	Regulación de respuestas inmunes adaptativas	CD40, CD86, FOXP3, IFNG , IL-2, IL-4R , PTPRC , SPN , TGFB1
	Activación de linfocitos T	BAX, CD48, CD86, FOXP3, ITGAL, IL-2, LCK, PTPRC , SPN , TGFB1 , ZAP70
	Regulación de procesos inmunes efectores	CD40, FOXP3, IFNG , IL-2, IRAK3, PTPRC , SPN , TGFB1 , TNF
	Regulación positiva de cambio de isotipo	CD40, IFNG , IL-2, PTPRC , TGFB1
	Regulación de la producción de inmunoglobulinas	CD40, IFNG , IL-2, PTPRC , TGFB1 , TNF
	Regulación de proliferación leucocitaria	CD40, FOXP3, IFNG , IL-2, PTPRC , SPN , TGFB1 , ZAP70
	Regulación de producción de citocinas	CD40, CD86, NLRP3, FOXP3, IFNG , IRAK3, SPN , TLR4 , TGFB1 , TNF
	Respuesta a bacterias	CTSG , CCL5 , IFNG , IRAK3, RNASE3, SPN , STAT1 , TLR4 , TNF
	Respuesta a virus	NLRP3, CCL5 , IFNG , IRAK3, PTPRC , STAT1 , TNF
	Desarrollo del sistema inmune	BAX, IL-2, LCK, PTPRC , SPN , TGFB1 , TNF, LYN, ZAP70
	Regulación de la activación de linfocitos B	CD40, IFNG , IL-2, PTPRC , TGFB1
REGULACIÓN DE RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTERNOS E.S: 2,64		CCL5 , IL-2, IL-8 , SPP1, SPN , TLR4 , TGFB1
ADHESIÓN CELULAR E.S: 2,29		CCL5 , CX3CR1, ITGAL, ITGB7, ITGB8, IL-2, PTPRC , SPP1, SELL , TNF, VCAN
MATRIZ EXTRACELULAR E.S: 1,91		CRTAP , CHI3L1 , LGALS3, PI3 , SPN , TGFB1 , VCAN
OTRAS		CPA3 , GPX3, GZMH , IL-1R2 , MSR1, NFATC1, ORMDL3, PTGER2, S1PR5, SCD, SVIL , TAGAP , TRIM37

En negrita están resaltados los genes asociados con la gravedad del asma. E.S: *Enrichment score*.

Tabla 16: Anotación de *clusters* funcionales de los 66 genes diferencialmente expresados entre el grupo AR y C

PROCESOS INFLAMATORIOS E.S: 10,65	Repuesta defensiva	CD40, CD48, NLRP3, S100A9, APAF1, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IFNG, IL-1R1, IL-10, IL-8, NCF2, NFKBIZ, PTPRC, RNASE3, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Respuesta inflamatoria	CD40, NLRP3, S100A9, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IL-10, IL-8, NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Respuesta ante una herida	BAX, CD40, NLRP3, S100A9, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IL-10, IL-8, NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN, VCAN
	Regulación positiva de procesos de organismos multicelulares	BAX, CD40, NLRP3, ALOX5, CCL5, IFNG, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1
PROCESOS DE RESPUESTA E.S: 5,98	Respuesta a sustancias orgánicas	CD48, CTSC, CCL5, DUSP1, IFNG, IL-1R1, IL-10, IRAK3, PRKACA, PRKACB, SPP1, SELL, STAT1, TLR4, TGB1, TNF, AKT1, LYN
	Respuesta a estímulos hormonales	CCL5, DUSP1, IL-10, PRKACA, PRKACB, SPP1, STAT1, TGB1, TNF, AKT1, LYN

REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

E.S: 5,25

BAX, NLRP3, APAF1, DUSP1, EIF5A, IFNG, IL-10, IL-2, IL2RB, LCK, PHILDA1, PTPRC, SPN, STAT1, SOS1, TLR4, TGFB1, TNF, TNFAIP3, AKT1

REGULACIÓN DE PROCESOS INMUNES I
E.S: 4,95

Regulación de la inmunidad mediada por leucocitos
Regulación de la proliferación de linfocitos T
Regulación positiva de procesos del sistema inmune

CD40, FOXP3, IFNG, IL-10, IL-2, IL2RB, PTPRC, SPN, TGFB1
FOXP3, IFNG, IL-10, IL-2, PTPRC, SPN, TGFB1, ZAP70
FOXP3, IL-10, IL-2, IL-4R, IRAK3, PTPRC, SPN, TGFB1

TRANSMISIÓN DE SEÑALES I
E.S: 4,42

Regulación positiva de la función molecular

BAX, NLRP3, APAF1, GADD45B, IFNG, IL-10, IL-2, IRAK3, LCK, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1

Regulación positiva de la actividad catalítica

BAX, NLRP3, APAF1, GADD45B, IFNG, IL-2, LCK, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1

Cascada de proteín-quinasas

GADD45B, IFNG, IL-10, MAPK13, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TLR4, TNF, AKT1, ZAP70

Regulación de la fosforilación

BAX, GADD45B, IFNG, IL-2, IRAK13, PRKACA, PRKACB, PTPRC, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN

TRANSMISIÓN DE SEÑALES IIE.S: 4,38

Transducción de señales reguladoras de la respuesta inmune

CD40, C3AR1, IRAK3, PTPRC, TLR4, LYN, ZAP70

Activación de la respuesta inmune

C3AR1, IRAK3, PTPRC, TLR4, LYN, ZAP70

REGULACIÓN DE PROCESOS INMUNES II
E.S: 3,48

Activación leucocitaria

BAX, CD40, CD48, CD86, FOXP3, ITGAL, IL-10, IL-2, IL-8, LCK, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, LYN, ZAP70

Regulación de la respuesta inmune adaptativa

CD40, CD86, FOXP3, IFNG, IL-10, IL-2, IL4R, PTPRC, SPN, TGFB1

Regulación de la producción de mediadores de la respuesta inmune

CD40, FOXP3, IFNG, IL-10, IL-2, IRAK3, PTPRC, TGFB1, TNF

Regulación de procesos inmunes efectores

CD40, FOXP3, IFNG, IL-10, IL-2, IRAK3, PTPRC, SPN, TGFB1, TNF

Regulación positiva de cambio de isotipo

CD40, IFNG, IL-10, IL-2, PTPRC, TGFB1

Regulación de proliferación leucocitaria

CD40, FOXP3, IFNG, IL-10, IL-2, PTPRC, SPN, TGFB1, ZAP70

Regulación de producción de citocinas

CD40, CD86, NLRP3, FOXP3, IFNG, IL-10, IRAK3, SPN, TLR4, TGFB1, TNF

Regulación de la inmunidad mediada por linfocitos B

CD40, IFNG, IL-10, IL-2, PTPRC, TGFB1

Respuesta a bacterias

CCL5, IFNG, IL-10, IRAK3, RNASE3, SPN, STAT1, TLR4, TNF

Desarrollo del sistema inmune

BAX, IL-10, IL-2, LCK, PTPRC, SPN, TGFB1, TNF, LYN, ZAP70

Migración leucocitaria

S100A9, CCL5, IFNG, IL-10, IL-8, TNF

Quimiotaxis

S100A9, CCL5, C3AR1, FPR3, IFNG, IL-10, IL-8, SPN

Regulación de la respuesta inflamatoria

CCL5, IL-10, IL-2, SPN, TLR4

REGULACIÓN DE RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTERNOS E.S: 3,06

CCL5, IL-10, IL-2, IL8, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1

ADHESIÓN CELULAR E.S: 2,21

CCL5, ITGAL, ITGB7, ITGB8, IL-2, PTPRC, SPP1, SELL, TNF, VCAN

MATRIZ EXTRACELULAR E.S: 2,00

CRTAP, CHI3L1, LGALS3, PI3, SPN, TGFB1, VCAN

OTRAS

CPA3, GPX3, GZMH, IL-1R2, NFATC1, ORMDL3, PTGER2, RNASE3, S1PR5, SVIL, TAGAP, TRIM37

E.S: *Enrichment score.*

Los genes con expresión diferencial estadísticamente significativa se analizaron a nivel proteico con el programa STRING 10, que permite definir redes de interacciones proteicas. Los resultados estuvieron acordes a los obtenidos en los análisis génicos y mostraron las complejas y fuertes interacciones existentes en los fenotipos clínicos alérgicos (Figura 6B y C) y una red más clara para el fenotipo clínico ANA, donde se observa un núcleo central compuesto por IL-8 y TNF (Figura 6A).

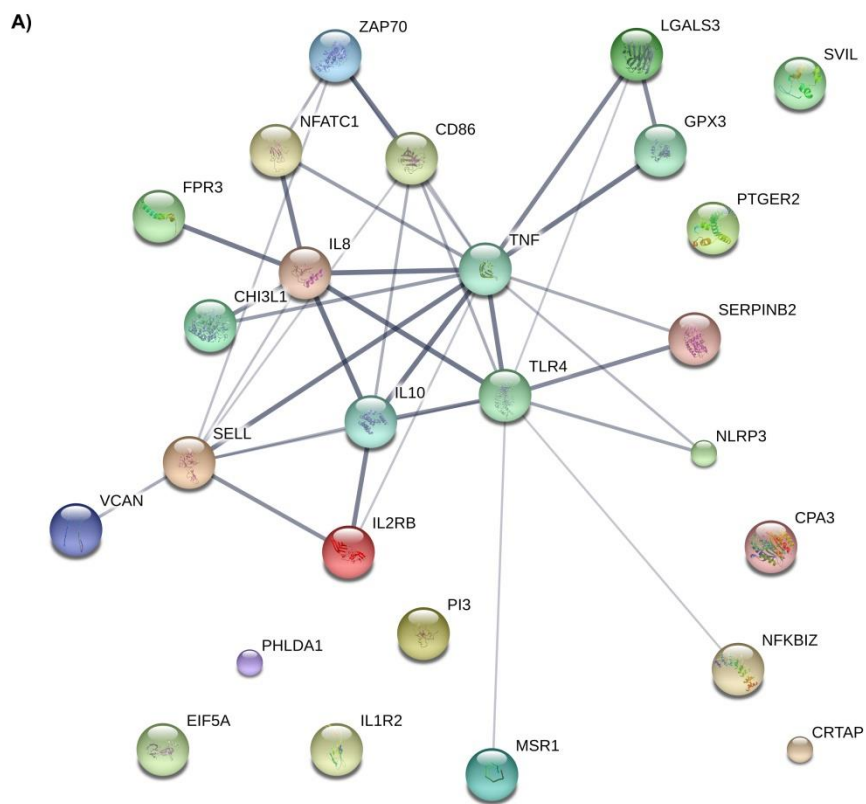


Figura 6: Gráficas de interacción proteica. Red de interacción para las proteínas codificadas por los genes significativos según el programa STRING 10. A) Los 26 genes del grupo con asma no alérgica. B) Los 69 genes del grupo con asma alérgica. C) Los 66 genes del grupo con alergia sin asma.

2.7. Análisis de sensibilidad y especificidad por curvas ROC

Para evaluar el potencial como biomarcadores de los genes estadísticamente distintos entre los grupos clínicos estudiados, se realizó un análisis de sensibilidad frente a especificidad, por curvas ROC, de los genes relevantes en la gravedad asmática (Tabla 13). Según el criterio descrito en el Apartado 11 de Materiales y Métodos, se agruparon los genes en 5 categorías a partir de los resultados de este análisis.

2.7.1. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos y grupo control

Estos resultados se muestran en la Tabla 17. Se analizaron por curvas ROC, los nueve genes más relevantes del grupo ANA, los 35 del grupo AA y los 37 del grupo AR al comparar la expresión génica en estos grupos globalmente y en función de la gravedad, frente al grupo C.

Al comparar los sujetos del grupo C y ANA (Tabla 17A), se encontró que todos los genes se incluirían en la categoría de test bueno, excepto *CHI3L1*, *IL-1R2* y *PI3*. Los resultados de las curvas ROC de *CHI3L1* e *IL-1R2* mostraron un resultado muy bueno (AUC: 0,95 y 0,93, respectivamente) y *PI3* de excelente (AUC: 0,99). La Figura 7 muestra un ejemplo representativo de la representación gráfica de un análisis por curva ROC de la expresión génica (utilizando los valores medios del ΔCt), en concreto el de *PI3* al comparar el grupo control con los pacientes ANA.

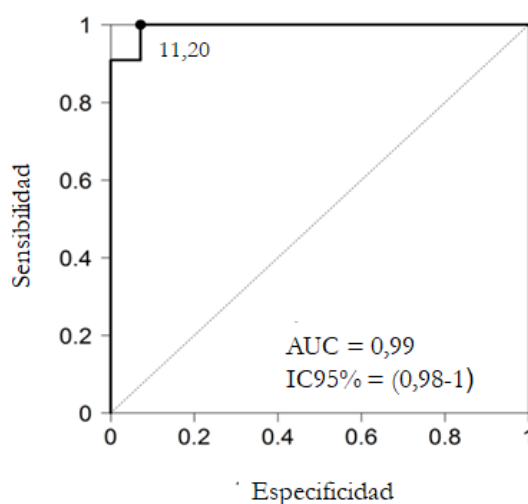


Figura 7: Ejemplo de una curva ROC de un test excelente. Representación gráfica de la comparación de la expresión génica de *PI3* en el grupo ANA *vs.* el grupo C. 11,20 es el valor umbral o ΔCt que permite la mejor discriminación entre el grupo ANA y el grupo C. AUC: área bajo la curva. IC95%: intervalo de confianza del 95 %.

Al analizar las curvas según la gravedad del grupo ANA (Tabla 17A), los resultados varían. Si se comparan los sujetos C con los pacientes con ANA grave, *CPA3*, *IL-8*, *PHLDA1* y *SERPINB2* (AUC: 0,88, 0,89, 0,89 y 0,82, respectivamente) mantienen su categoría de test buenos, *IL-1R2* de test muy bueno y *PI3* mantiene su posición de test excelente (AUC: 1), por lo que su capacidad para discriminar sujetos sanos de pacientes enfermos no cambia para el grupo de ANA grave. Por otro lado, *IL-10* y *MSR1* suben su posición a test muy bueno (AUC: 0,91, 0,94 y 0,94, respectivamente) y *CHI3L1* la baja a test bueno (AUC: 0,89). La comparación de los sujetos C y ANA moderados-leves de nuevo se diferencia del análisis global en algunos genes. *CPA3*, *IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1* y *SERPINB2* (AUC: 0,88, 0,79, 0,82, 0,77 y 0,86, respectivamente) siguen manteniendo su categoría de test buenos, mientras que *IL-8* mejora su capacidad discriminatoria (test muy bueno, AUC de 0,91). Además, *IL-1R2* sigue siendo un test muy bueno y *PI3* mantiene su posición de test excelente, junto con *CHI3L1* (AUC: 1) que en esta discriminación, se posiciona como un test excelente.

El siguiente análisis fue la comparación de los valores AUC de los pacientes con clínica ANA moderada-leve frente a grave. Todos los genes tuvieron una categoría regular o mala.

Para el grupo AA, se realizó el mismo análisis con los 35 genes que cumplieron el criterio de RQ menor que 0,25 (Tabla 17B). Primero, la comparación del grupo C con el grupo total de AA, dio lugar a biomarcadores que se clasificaban entorno a las categorías excelente (*CHI3L1* con AUC de 0,99, *IL-1R2* con AUC de 0,98 y *PI3* con AUC de 0,99), muy buena (10 biomarcadores) y buena (19 biomarcadores). Solo 2 genes, *CRTAP* y *SOS1* (AUC 0,66 y 0,72, respectivamente), se clasificaron como test regulares en esta comparación, y uno, *SCD* (AUC: 0,57), como test malo. Cuando se compararon los pacientes con asma alérgica grave con el grupo sano, la distribución se concentra en la categoría buena (21 biomarcadores). *PI3* es el único que se mantiene como biomarcador excelente (AUC: 1), en la categoría muy buena se encontraron 7 genes (*CHI3L1*, *CPA3*, *IL-1R2*, *IL-8*, *LYN*, *TNF*, *TNFAIP3*) en la regular 2 (*PRKACA* con AUC de 0,72 y *SOS1* con AUC de 0,67) y en la mala otros 2 (*CRTAP* y *SCD* con AUC de 0,57 ambos). *ALOX15* y *CTSG* no se pudieron valorar por falta de datos. Para la comparación del grupo C frente pacientes con AA moderada-leve, el número de genes con clasificación excelente aumenta con *CHI3L1*, *CPA3*, *IL-1R2*, *LYN*, *PI3* y *TAGAP* (AUC: 1, 0,98, 0,99, 1, 0,99 y 0,99, respectivamente) y la de regulares se mantiene igual, pero con *CRTAP*, con valor AUC de 0,75 y *SCD*, con valor AUC 0,70. El resto de genes se reparten entre la clasificación muy buena (13 genes) y buena (14 genes).

Finalmente, al realizar el análisis de discriminación para los subgrupos de pacientes con asma grave y asma moderada-leve, todos los marcadores fueron test regulares (15) y pobres (20). De nuevo, *ALOX15* y *CTSG* no se pudieron valorar.

La Figura 8 muestra la representación gráfica de la curva ROC de *ALOX5* (AUC: 0,51) como ejemplo de un biomarcador con resultado pobre, es decir, con poca capacidad para discernir la gravedad del asma en pacientes con AA.

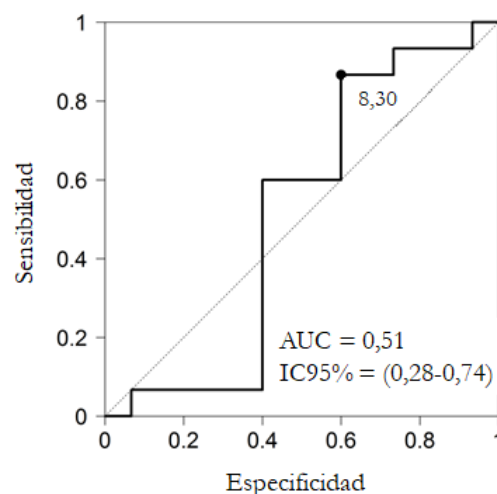


Figura 8: Ejemplo de una curva ROC de un test pobre. Representación gráfica de la comparación de la expresión génica de *ALOX5* entre grupo AA moderado-leve *vs.* el grupo AA grave. 8,3 es el valor umbral o ΔC_t que permite la mejor discriminación entre el grupo AA moderado-leve y el grupo AA grave. AUC: área bajo la curva. IC95%: intervalo de confianza del 95%.

Por último, los resultados del grupo AR se muestran en la Tabla 17C. De los 37 genes que cumplían el criterio de RQ menor que 0,25, 11 tuvieron una clasificación buena para discernir los pacientes con AR de los sujetos control. Estos fueron *CCL5*, *CD48*, *CRTAP*, *IL-1R2*, *IL-4R*, *NLRP3*, *PI3*, *SELL*, *TAGAP*, *TGFB1* y *TLR4* y sus valores AUC oscilaron entre 0,77 y 0,87. El resto de genes se clasificaron según este análisis como test regulares (23 genes) o malos (*IL-10*, *SCD* y *TRIM37*).

Tabla 17: Clasificación y categorización de los biomarcadores a nivel de expresión génica por el análisis de curvas ROC

A. Grupo ANA

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50 -0,60)
C <i>vs.</i> ANA	PI3: 0,99	CHI3L1: 0,95 IL-1R2: 0,93	CPA3: 0,88 IL-8: 0,90 IL-10: 0,87 MSR1: 0,89 PHDLA1: 0,83 SERPINB2: 0,84		
C <i>vs.</i> ANA G	PI3: 1	IL-10: 0,94 IL-1R2: 0,93 MSR1: 0,94	CHI3L1: 0,89 CPA3: 0,88 IL-8: 0,89 PHDLA1: 0,89 SERPINB2: 0,82		
C <i>vs.</i> ANA ML	CHI3L1: 1 PI3: 0,99	IL-1R2: 0,93 IL-8: 0,91	CPA3: 0,88 IL-10: 0,79 MSR1: 0,82 PHDLA1: 0,77 SERPINB2: 0,86		
ANA ML <i>vs.</i> ANA G				CPA3: 0,65 MSR1: 0,66 PHDLA1: 0,62	CHI3L1 < 0,50 IL-10: 0,51 IL-1R2: 0,56 IL-8: 0,53 PI3: 0,60 SERPINB2: 0,51

B. Grupo AA

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50 -0,60)
C <i>vs.</i> AA	CHI3L1: 0,99 IL-1R2: 0,98 PI3: 0,99	CPA3: 0,97 IL-4R: 0,92 IL-8: 0,93 LYN: 0,95 NFKBIZ: 0,93 SELL: 0,92 SVIL: 0,92 TAGAP: 0,93 TNF: 0,92 TNFAIP3: 0,95	ALOX15: 0,85 ALOX5: 0,79 APAF1: 0,87 C3AR1: 0,80 CCL5: 0,87 CTSG: 0,76 DUSP1: 0,89 GADD45B: 0,89 GZMH: 0,83 IFNG: 0,85 IRAK3: 0,79 NCF2: 0,86 PRKACA: 0,79 PTPRC: 0,85 S100A9: 0,90 SPN: 0,82 STAT1: 0,90 TGFB1: 0,90 TLR4: 0,88	CRTAP: 0,66 SOS1: 0,72	SCD: 0,57
C <i>vs.</i> AA G	PI3: 1	CHI3L1: 0,97 CPA3: 0,96 IL-1R2: 0,96 IL-8: 0,91 LYN: 0,91 TNF: 0,91 TNFAIP3: 0,93	ALOX5: 0,78 APAF1: 0,86 C3AR1: 0,80 CCL5: 0,85 DUSP1: 0,87 GADD45B: 0,87 GZMH: 0,82 IFNG: 0,84 IL-4R: 0,89 IRAK3: 0,70 NCF2: 0,78 NFKBIZ: 0,90 PTPRC: 0,88 S100A9: 0,89 SELL: 0,90 SPN: 0,83 STAT1: 0,85 SVIL: 0,90 TAGAP: 0,87 TGFB1: 0,83 TLR4: 0,80	PRKACA: 0,72 SOS1: 0,67	ALOX15: ND CRTAP: 0,57 CTSG: ND SCD: 0,57

C	<i>CHI3L1</i> : 1	<i>GADD45B</i> : 0,91	<i>ALOX15</i> : 0,87	<i>CRTAP</i> : 0,75
<i>vs.</i>	<i>CPA3</i> : 0,98	<i>IL4R</i> : 0,94	<i>ALOX5</i> : 0,79	<i>SCD</i> : 0,70
AA ML	<i>IL1R2</i> : 0,99	<i>IL8</i> : 0,94	<i>APAF1</i> : 0,89	
	<i>LYN</i> : 1	<i>NCF2</i> : 0,94	<i>DUSP1</i> : 0,90	
	<i>PI3</i> : 0,99	<i>NFKBIZ</i> : 0,96	<i>C3AR1</i> : 0,81	
	<i>TAGAP</i> : 0,99	<i>S100A9</i> : 0,92	<i>CCL5</i> : 0,88	
		<i>SELL</i> : 0,94	<i>CTSG</i> : 0,83	
		<i>STAT1</i> : 0,95	<i>GZMH</i> : 0,83	
		<i>SVIL</i> : 0,95	<i>IFNG</i> : 0,87	
		<i>TGFB1</i> : 0,96	<i>IRAK3</i> : 0,87	
		<i>TLR4</i> : 0,95	<i>PRKACA</i> : 0,87	
		<i>TNF</i> : 0,92	<i>PTPRC</i> : 0,81	
		<i>TNFAIP3</i> : 0,97	<i>SOS1</i> : 0,78	
			<i>SPN</i> : 0,80	
AA ML			<i>CHI3L1</i> : 0,69	<i>ALOX15</i> : ND
<i>vs.</i>			<i>CPA3</i> : 0,67	<i>ALOX5</i> : 0,51
AA G			<i>CRTAP</i> : 0,66	<i>APAF1</i> : 0,50
			<i>GZMH</i> : 0,64	<i>C3AR1</i> : 0,53
			<i>IL1R2</i> : 0,65	<i>CCL5</i> : 0,54
			<i>IL8</i> : 0,63	<i>CTSG</i> : ND
			<i>IRAK3</i> : 0,73	<i>DUSP1</i> : 0,56
			<i>NFKBIZ</i> : 0,63	<i>GADD45B</i> : 0,52
			<i>PTPRC</i> : 0,67	<i>IFNG</i> : 0,55
			<i>SCD</i> : 0,72	<i>IL4R</i> : 0,50
			<i>SELL</i> : 0,68	<i>LYN</i> : 0,50
			<i>SPN</i> : 0,64	<i>NCF2</i> : 0,60
			<i>SVIL</i> : 0,67	<i>PI3</i> : 0,50
			<i>TGFB1</i> : 0,62	<i>PRKACA</i> : 0,58
			<i>TLR4</i> : 0,72	<i>S100A9</i> : 0,53
				<i>SOS1</i> : 0,50
				<i>STAT1</i> : 0,52
				<i>TAGAP</i> : 0,50
				<i>TNF</i> : 0,55
				<i>TNFAIP3</i> : 0,50

C. Grupo AR

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50-0,60)
C			<i>CCL5</i> : 0,87	<i>C3AR1</i> : 0,67	<i>IL10</i> : 0,50
<i>vs.</i>			<i>CD48</i> : 0,79	<i>CHI3L1</i> : 0,71	<i>SCD</i> : 0,55
AR			<i>CRTAP</i> : 0,79	<i>DUSP1</i> : 0,69	<i>TRIM37</i> : 0,57
			<i>IL1R2</i> : 0,82	<i>GADD45B</i> : 0,69	
			<i>IL4R</i> : 0,79	<i>GPX3</i> : 0,73	
			<i>NLRP3</i> : 0,77	<i>GZMH</i> : 0,74	
			<i>PI3</i> : 0,81	<i>IFNG</i> : 0,73	
			<i>SELL</i> : 0,78	<i>IL1R1</i> : 0,66	
			<i>TAGAP</i> : 0,84	<i>IL2RB</i> : 0,70	
			<i>TGFB1</i> : 0,77	<i>IL8</i> : 0,72	
			<i>TLR4</i> : 0,86	<i>IRAK3</i> : 0,70	
				<i>LYN</i> : 0,72	
				<i>NEATC1</i> : 0,61	
				<i>PHLDA1</i> : 0,64	
				<i>PRKACA</i> : 0,65	
				<i>PTPRC</i> : 0,72	
				<i>S100A9</i> : 0,72	
				<i>SPN</i> : 0,68	
				<i>SPP1</i> : 0,64	
				<i>SVIL</i> : 0,71	
				<i>TNF</i> : 0,72	
				<i>TNFAIP3</i> : 0,73	
				<i>VCAN</i> : 0,74	

A) Clasificación de los genes grupo ANA que cumplían el criterio $RQ > 4$ o $< 0,25$. B) Clasificación de los genes del grupo AA que cumplían el criterio $RQ < 0,25$. C) Clasificación de los genes del grupo AR que cumplían el criterio $RQ < 0,25$. Los genes con valores $AUC < 0,50$ o que por falta de datos no se pudo determinar (ND) se incluyen en la columna denominada pobre. AUC: área bajo la curva. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve.

2.7.2. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos

El siguiente estudio fue realizar la comparativa entre los fenotipos clínicos con el análisis por curvas ROC de la expresión génica de los genes comunes. Los 2 grupos con pacientes con asma compartían 5 genes (*CHI3L1*, *CPA3*, *IL-1R2*, *IL-8* y *PI3*) y los grupos con pacientes alérgicos, 26 genes (según el criterio $RQ > 4$ o $< 0,25$). Los resultados se resumen en la Tabla 18. En la comparación de los pacientes con ANA y con AA (Tabla 18A), *CPA3* (AUC: 0,77) fue un test bueno para discernir entre estas patologías. El resto fueron biomarcadores regulares. En el análisis de la comparación por gravedad de asma, la expresión génica de *PI3* (AUC: 0,78) fue un test bueno para discriminar los 2 grupos de pacientes con asma grave. El resto fueron regulares (*CPA3*, *IL-1R2* e *IL-8*) o malos (*CHI3L1*). Por otro lado, en los 2 grupos de pacientes con asma moderada-leve, *CPA3* e *IL-8* (AUC: 0,89 y 0,87, respectivamente) fueron buenos test para discriminar pacientes con ANA moderada-leve y AA moderada-leve. Los otros 3 genes fueron regulares.

También se comparó por curvas ROC, la expresión génica de los 26 genes que compartían los grupos con alergia, es decir, el grupo AA y el grupo AR (Tabla 18B). *PI3* (AUC: 0,99) fue un biomarcador excelente para esta discriminación y *CHI3L1* (AUC: 0,95) e *IL-8* (AUC: 0,92) muy buenos. Nueve de los genes se clasificaron como test buenos (*DUSP1*, *IL-1R2*, *IL-4R*, *LYN*, *SVIL*, *TAGAP*, *TGFB1*, *TNF*, *TNFAIP3*) y 10 como regulares. Los 4 restantes (*C3AR1*, *IRAK3*, *SCD* y *TLR4*) fueron de categoría pobre. Cuando se comparó la expresión génica de estos 26 genes entre los pacientes con AA grave y los sujetos con AR, *PI3* (AUC: 0,99) y *CHI3L1* (AUC: 0,92) permanecieron en las categorías altas de la clasificación (excelente y muy buena, respectivamente). El resto de genes entraron dentro de las categorías de test buenos (7 genes: *DUSP1*, *IL-1R2*, *IL-4R*, *IL-8*, *LYN*, *TNF*, *TNFAIP3*), regulares (13) y malos (4: *C3AR1*, *IRAK3*, *PRKACA* y *TLR4*). Para discernir los pacientes con AA moderada-leve de los pacientes con AR, la Tabla 18B muestra a *PI3* como biomarcador excelente (AUC: 0,99), a *CHI3L1*, *IL-1R2*, *IL-8* y *TAGAP* como muy buenos (AUC: 0,92, 0,93 y 0,94, respectivamente) y a otros 7 genes (*DUSP1*, *IL-4R*, *LYN*, *SVIL*, *TGFB1*, *TNF*, *TNFAIP3*), como buenos. Los genes restantes fueron regulares (10 genes) y malos (4: *C3AR*, *CCL5*, *CRTAP* y *GZMH*) para diferenciar los sujetos con AA moderada-leve de los que padecían de AR.

Tabla 18: Clasificación y categorización de los biomarcadores a nivel de expresión génica por el análisis de curvas ROC. Comparación entre fenotipos clínicos

A. Grupo ANA comparado con el grupo AA

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50 -0,60)
ANA vs. AA			CPA3: 0,77	CHI3L1: 0,61 IL-1R2: 0,74 IL-8: 0,72 PI3: 0,74	
ANA G vs. AA G			PI3: 0,78	CPA3: 0,63 IL-1R2: 0,73 IL-8: 0,61	CHI3L1 < 0,50
ANA ML vs. AA ML			CPA3: 0,89 IL-8: 0,87	CHI3L1: 0,74 IL-1R2: 0,71 PI3: 0,73	

B. Grupo AA comparado con el grupo AR

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50 -0,60)
AA vs. AR	PI3: 0,99	CHI3L1: 0,95 IL-8: 0,92	DUSP1: 0,78 IL-1R2: 0,90 IL-4R: 0,80 LYN: 0,85 SVIL: 0,76 TAGAP: 0,83 TGFB1: 0,76 TNF: 0,82 TNFAIP3: 0,83	CCL5: 0,61 CRTAP: 0,66 GADD45B: 0,67 GZMH: 0,62 IFNG: 0,68 PRKACA: 0,63 PTPRC: 0,69 S100A9: 0,66 SELL: 0,67 SPN: 0,63	C3AR1: 0,57 IRAK3 < 0,50 SCD: 0,51 TLR4: 0,56
AA G vs. AR	PI3: 0,99	CHI3L1: 0,92	DUSP1: 0,78 IL-1R2: 0,88 IL-4R: 0,78 IL-8: 0,90 LYN: 0,79 TNF: 0,80 TNFAIP3: 0,80	CCL5: 0,62 CRTAP: 0,72 GADD45B: 0,65 GZMH: 0,70 IFNG: 0,68 PTPRC: 0,73 S100A9: 0,64 SCD: 0,61 SELL: 0,71 SPN: 0,64 SVIL: 0,72 TAGAP: 0,72 TGFB1: 0,63	C3AR1: 0,57 IRAK3 < 0,50 PRKACA: 0,56 TLR4: 0,57
AA ML vs. AR	PI3: 0,99	CHI3L1: 0,97 IL-1R2: 0,92 IL-8: 0,93 TAGAP: 0,94	DUSP1: 0,79 IL-4R: 0,82 LYN: 0,90 SVIL: 0,80 TGFB1: 0,90 TNF: 0,84 TNFAIP3: 0,85	GADD45B: 0,70 IFNG: 0,67 IRAK3: 0,70 PRKACA: 0,70 PTPRC: 0,64 S100A9: 0,69 SCD: 0,63 SELL: 0,63 SPN: 0,61 TLR4: 0,68	C3AR1: 0,57 CCL5: 0,60 CRTAP: 0,59 GZMH: 0,54

A) Clasificación de los genes de la comparación entre el grupo ANA y AA. Se hizo el análisis de los genes comunes a ambos grupos que cumplían el criterio $RQ > 4$ o $< 0,25$. B) Clasificación de los genes de la comparación entre el grupo AA y AR. Se hizo el análisis de los genes comunes a ambos grupos del que cumplían el criterio $RQ < 0,25$. Los genes con valores $AUC < 0,50$ o que por falta de datos no se pudo determinar (ND) se incluyen en la columna denominada pobre. AUC: área bajo la curva. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve.

3. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA GRAVEDAD DEL GRUPO CON ASMA NO ALÉRGICA

Para intentar definir mecanismos de regulación de los genes más relevantes, se realizó un estudio epigenético en una pequeña población de P1.

Se estudiaron las modificaciones epigenéticas de metilación de 5 de los 9 genes previamente asociados con la gravedad del ANA, de los cuales 3 se sobreexpresaban y 2 estaban reprimidos: *CHI3L1*, *MSR1*, *PHLDA1*, *PI3* y *SERPINB2* en una población de pacientes asmáticos no alérgicos graves (n=12) y un grupo de sujetos controles sanos (n=12). Este estudio pretende definir si hay o no diferencias de metilación en los genes que puedan explicar las diferencias de expresión previamente obtenidas. En caso afirmativo, se analizará en profundidad la implicación de esta metilación en relación tanto con la expresión génica como proteica.

Los *primers*, diseñados según se describe en el Apartado 9 de Materiales y Métodos, permiten estudiar: 5 islas CpG próximas a la zona promotora en *MSR1*, *PI3* y *SERPINB2*, 8 en *CHI3L1* y 35 en *PHLDA1*. Los resultados se resumen en la Figura 9. *CHI3L1* mostró un incremento de metilación estadísticamente significativo, en el grupo ANA grave comparado con el grupo control, en todas las islas CpG analizadas (CpG1: $3,32 \pm 0,99$ % *vs.* $2,47 \pm 0,83$ %, $p= 0,0337$; CpG4: $15,64 \pm 2,53$ % *vs.* $13,07 \pm 3,03$ %, $p= 0,0345$; CpG5: $48,26 \pm 5,34$ % *vs.* $25,69 \pm 4,36$ %, $p< 0,0001$; CpG6 y 7: $48,71 \pm 4,92$ % *vs.* $24,74 \pm 3,21$ %, $p< 0,0001$; respectivamente) (Figura 9A). La isla CpG 4 de *MSR1* mostró un porcentaje de metilación alto en el grupo con fenotipo clínico ($96,78 \pm 2,03$ %), con diferencias significativas ($p= 0,0461$), al compararlo con el del grupo C ($94,33 \pm 3,45$ %) (Figura 9B). *PHLDA1* presentó diferencias estadísticamente significativas en el grado de metilación en dos de las islas estudiadas: la isla CpG 8 ($5,42 \pm 2,76$ % grupo C *vs.* $3,06 \pm 2,81$ % grupo con ANA grave, $p= 0,0496$) que estaba hipometilada y la isla 23 ($6,56 \pm 3,86$ % grupo C *vs.* $9,83 \pm 3,69$ % grupo con ANA grave, $p= 0,0448$), hipermetilada en el grupo ANA grave respecto de los sujetos C (Figura 9C). En *PI3*, el grupo clínico ANA grave presentó una hipermetilación con respecto al grupo C en las islas CpG 2 ($69,58 \pm 16,28$ % *vs.* $42,83 \pm 20,40$ %, respectivamente, $p= 0,0018$), 3 ($81,19 \pm 9,06$ % *vs.* $71,28 \pm 10,83$ %, respectivamente, $p=0,0236$) y 4 ($57,22 \pm 15,39$ % *vs.* $33,00 \pm 20,45$ %, respectivamente, $p= 0,0034$) (Figura 9D). *SERPINB2* fue el único gen que mostró porcentajes de metilación similares en todos los sujetos estudiados (Figura 9E).

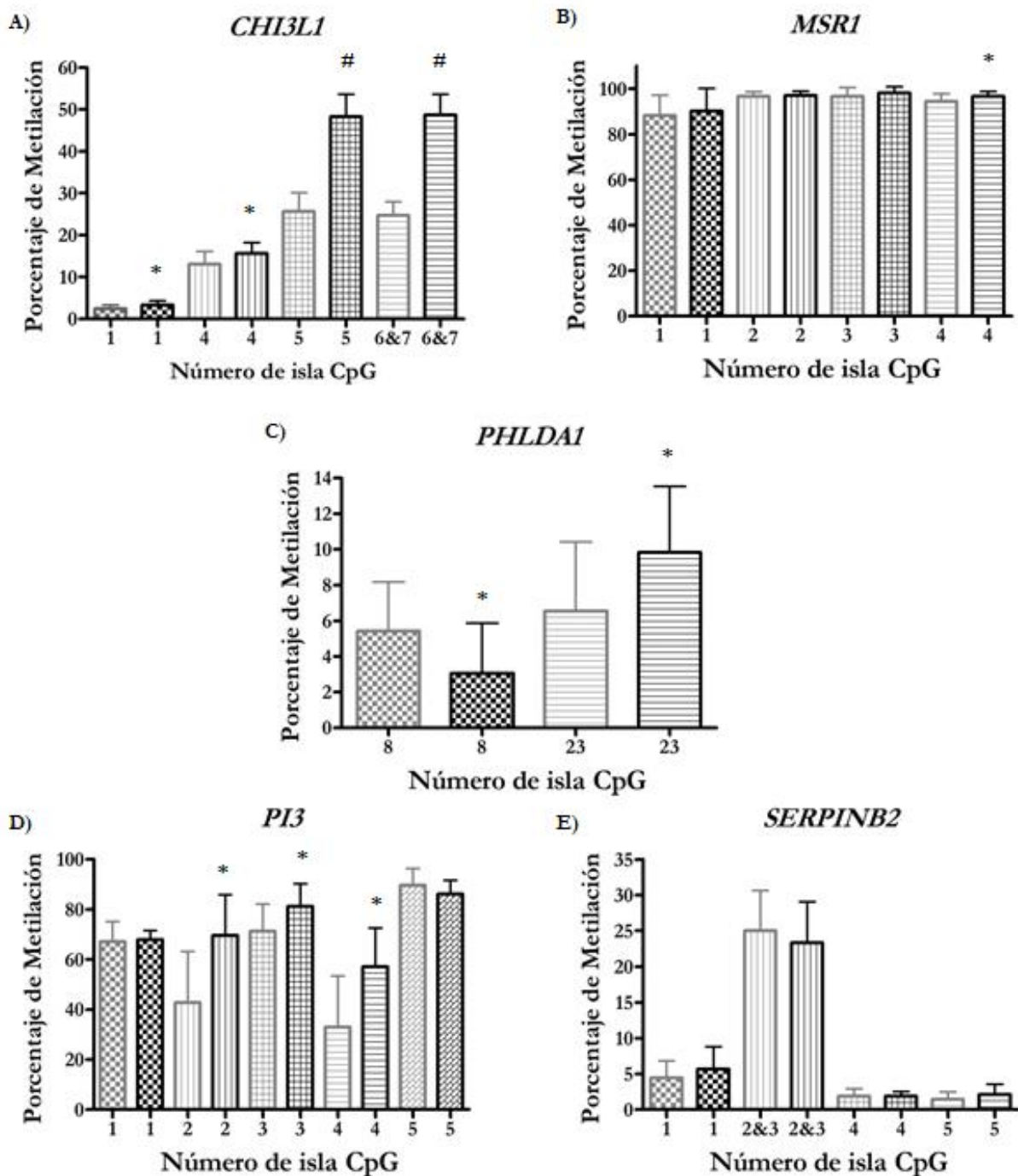


Figura 9: Resultados del análisis de metilación. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre la isla indicada del grupo ANA grave y su correspondiente isla del grupo C. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre la isla indicada del grupo ANA grave y su correspondiente isla del grupo C. En gris se muestra el grupo C y en negro el grupo ANA grave. En la gráfica de *PHLDA1*, debido al gran número de islas CpG analizadas (35), se muestran solo las islas CpG que dieron un resultado significativo (5).

4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL

Se realizó un estudio de la expresión proteica de los genes más relevantes midiendo los niveles de proteína en las PBMC o en el suero de los distintos grupos clínicos. A partir de este estudio, se realizó un análisis por curvas ROC para definir la capacidad discriminatoria de estas proteínas como biomarcadores diferenciales entre los distintos fenotipos clínicos del estudio.

4.1. Análisis de los niveles de expresión proteica

Se midieron los niveles proteicos de 7 de los 9 marcadores génicos más diferenciales del asma no alérgica (Tabla 13A) y POSTN (o periostina, como marcador establecido de respuesta Th2) en la población total de estudio, P1. En principio no se estudió la expresión proteica de CPA3 e IL-1R2, porque su expresión génica en alguna de las tres comparaciones analizadas (C *vs.* ANA, C *vs.* ANA grave o C *vs.* ANA moderada-leve) no cumplía los criterios de significación establecidos ($RQ > 4$ o $< 0,25$, ver Tabla 13). MSR1, SERPINB2 y PHLDA1 se analizaron en el extracto proteico total, extraído de PBMC de la población P1 por *western blot* (según se detalla en el Apartado 10.1 de Materiales y Métodos). Los niveles proteicos de IL-8, IL-10, CHI3L1, PI3 y POSTN se determinaron por ELISA en el suero de la misma población de estudio (Apartado 10.2 de Materiales y Métodos). La cuantificación relativa (expresado por CR en las proteínas analizadas por *western blot*) y los niveles medios en suero (expresado en pg/ml) del resto de proteínas estudiadas, se resumen en las Figuras 10 (comparaciones entre fenotipos clínicos globales) y 11 (comparaciones entre grupos atendiendo a la gravedad de asma). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre alguno de los grupos, en la expresión proteica de MSR1, SERPINB2, IL-8, CHI3L1 y POSTN.

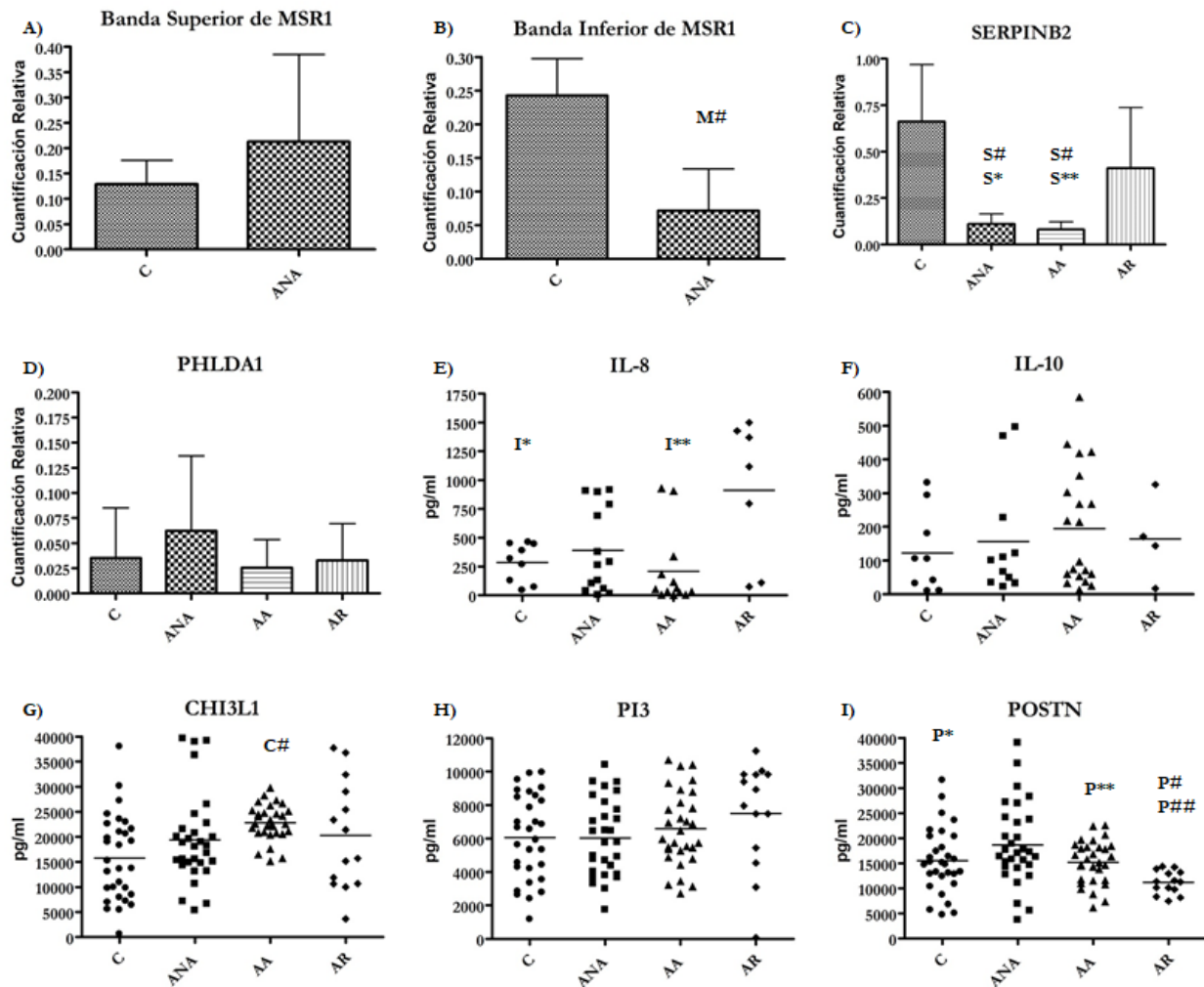


Figura 10: Comparación de la expresión proteica entre fenotipos clínicos, de los 9 potenciales biomarcadores analizados. A) Cuantificación relativa de la banda superior de MSR1 de los grupos C y ANA. B) Cuantificación relativa de la banda inferior de MSR1 de los grupos C y ANA. M#: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre el grupo ANA y el grupo C. C) Cuantificación relativa de la banda de SERPINB2 en los 4 grupos de estudio. S*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo ANA y el grupo AR. S**: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo AA y el grupo AR. S#: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre el grupo indicado y el grupo C. D) Cuantificación relativa de la banda de PHLDA1 en los 4 grupos de estudio. E) Niveles medios en suero de la proteína IL-8. I*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo C y el grupo AR. I**: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo AA y el grupo AR. F) Niveles medios en suero de la proteína IL-10 en los grupos de estudio. G) Niveles medios en suero de la proteína CHI3L1 en los 4 grupos estudiados. C*: Comparación estadísticamente significativa ($p = 0,0001$) entre el grupo AA y el grupo C. H) Niveles medios en suero de la proteína PI3. I) Niveles medios en suero de la proteína POSTN. P*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo C y el grupo AR. P**: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo AA y el grupo ANA. P#: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo AR y el grupo ANA. P##: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo AR y el grupo AA.

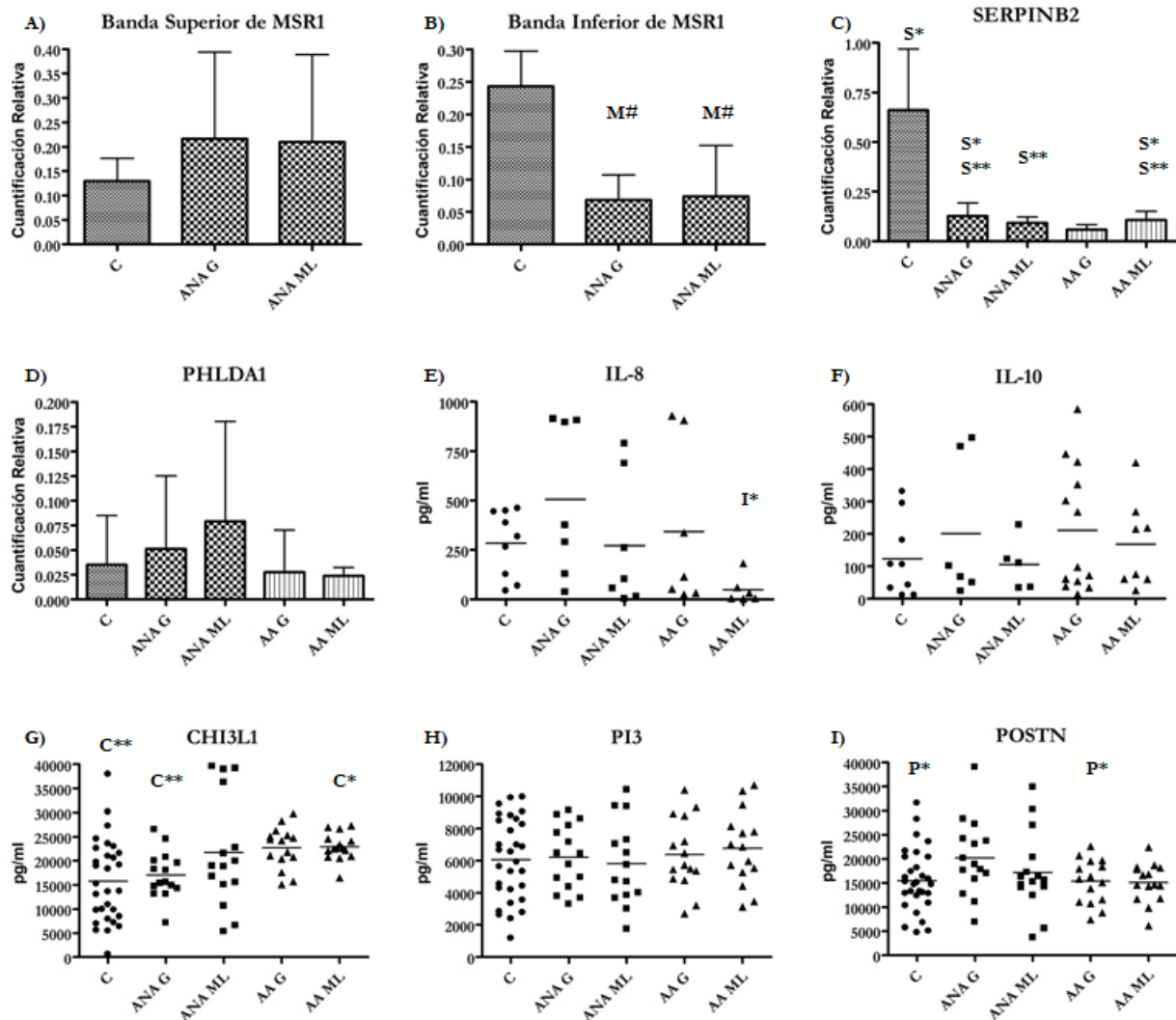


Figura 11: Comparación entre los subgrupos de gravedad de asma, de la expresión proteica de los 9 potenciales biomarcadores. A) Cuantificación relativa de la banda superior de MSR1 de los grupos C y los subgrupos de gravedad del fenotipo ANA. B) Cuantificación relativa de la banda inferior de MSR1 de los grupos C, ANA G y ANA ML. M#: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre el grupo indicado y el grupo C. C) Cuantificación relativa de la banda de SERPINB2 de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. S*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo AAG. S**: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo indicado y el grupo C. D) Cuantificación relativa de la banda de PHLDA1 de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. E) Niveles medios en suero de la proteína IL-8 de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. I*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo AA ML y el grupo ANA ML. F) Niveles medios en suero de la proteína IL-10 de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. G) Niveles medios en suero de la proteína CHI3L1 de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. C*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo AA ML y el grupo C. C**: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo indicado y el grupo AA G. H) Niveles medios en suero de la proteína PI3 de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. I) Niveles medios en suero de la proteína POSTN de los grupos C y los 4 subgrupos de gravedad. P*: Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo ANA G. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve.

MSR1 fue el gen más sobreexpresado de los sujetos con ANA, y sobre todo en los pacientes con diagnóstico grave. Debido a esto y para correlacionar su expresión génica con la proteica se midió en la proteína extraída de PBMC de 9 sujetos C y 19 pacientes con ANA. En el *western blot* de esta proteína se observaban dos bandas principales, la de mayor masa molecular de unos 100 kDa, próxima al marcador de masa molecular de 113 kDa (a la que denominaremos a partir de ahora banda superior) y la de menor de unos 70 kDa, localizada justo debajo del marcador de 72,7 kDa (denominada banda inferior). En la Figura 12 se muestra un ejemplo representativo de las bandas observadas en los resultados del *western blot* de *MSR1*. Al analizar la cuantificación relativa de las bandas respecto al control de carga (β -actina), se encontraron diferencias estadísticamente significativas solo en la banda inferior, con mayor expresión en los sujetos sanos ($0,24 \pm 0,05$ CR) que en los pacientes con ANA ($0,07 \pm 0,06$ CR, $p < 0,0001$). No hubo diferencias al comparar entre sí los pacientes en función del diagnóstico de gravedad, pero sí cuando los subgrupos de gravedad se compararon con el grupo C (ANA grave $0,07 \pm 0,04$ CR, $p < 0,0001$; ANA moderada-leve $0,07 \pm 0,08$ CR, $p < 0,0001$) (Figura 10B y 11B). La banda de mayor masa molecular estaba incrementada en el grupo de pacientes, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Este mismo comportamiento se observa al analizar la banda superior de los 2 subgrupos de gravedad del asma (moderado-leve y grave) comparado con el grupo C. Además, no hubo diferencias al compararlos entre sí (moderado-leve *vs.* grave).

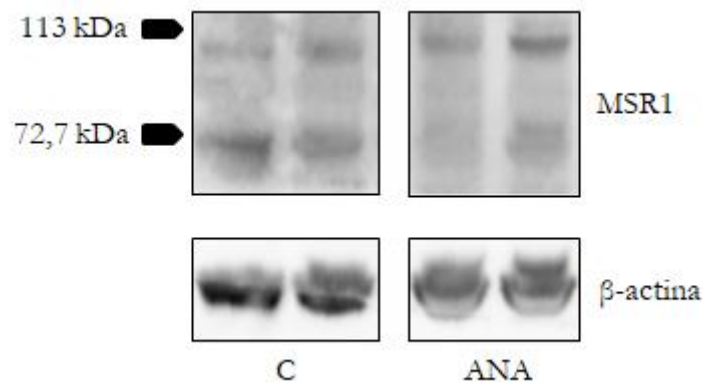


Figura 12: Ejemplo representativo del resultado de un *western blot* de *MSR1*. Se muestran los resultados de 2 sujetos C y 2 pacientes con ANA. Las flechas indican las masas moleculares de los marcadores próximos a las bandas de reconocimiento del anticuerpo monoclonal utilizado, según se especifica en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos.

Respecto a SERPINB2, la mayor expresión se encontró en el grupo C ($0,66 \pm 0,31$ CR), con diferencias estadísticamente significativas respecto a los pacientes con ANA ($0,11 \pm 0,05$ CR, $p < 0,0001$) y con AA ($0,08 \pm 0,04$ CR, $p < 0,0001$). Además, los dos grupos de pacientes con asma también mostraron una menor expresión que el grupo AR ($0,41 \pm 0,33$ CR; ANA *vs.* AR, $p = 0,0081$; AA *vs.* AR, $p = 0,004$) (Figura 10C). Al analizar SERPINB2 en función de la gravedad, cuyos resultados se representan en la Figura 11C, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C en todos los grupos de pacientes, ANA grave ($0,13 \pm 0,07$ CR, $p = 0,0019$), ANA moderada-leve ($0,09 \pm 0,03$ CR, $p = 0,0029$), AA grave ($0,06 \pm 0,02$ CR, $p = 0,0007$) y AA moderada-leve ($0,11 \pm 0,04$ CR, $p = 0,0034$). A su vez, al estudiar las comparaciones entre los subgrupos de gravedad se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos con asma grave, siendo la expresión mayor en los pacientes con ANA grave ($p = 0,0367$). Finalmente, dentro de los pacientes con AA se observó una expresión mayor en los pacientes con diagnóstico moderado-leve que en los pacientes con AA grave ($p = 0,039$). En la Figura 13 se muestra un ejemplo representativo de los resultados del *western blot* de SERPINB2.

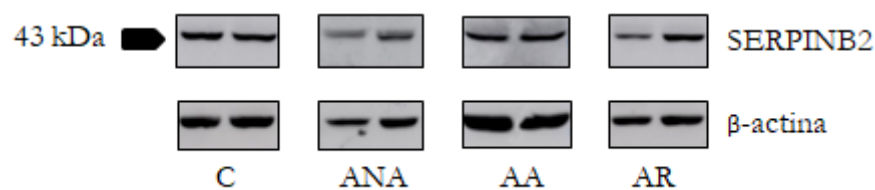


Figura 13: Ejemplo representativo del resultado de un *western blot* de SERPINB2. Se muestran los resultados de 2 sujetos C y 2 pacientes de cada grupo clínico: ANA, AA y AR. La flecha indica la masa molecular del marcador más próximo a la banda de reconocimiento del anticuerpo monoclonal utilizado, según se especifica en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos.

El análisis de los niveles de IL-8 indicó diferencias significativas entre el grupo de sujetos C y los pacientes con AA, comparados con el de pacientes con AR ($283,69 \pm 167,66$ pg/ml, $207,02 \pm 328,90$ pg/ml, $912,84 \pm 608,74$ pg/ml, respectivamente; C *vs.* AR $p = 0,0098$, AA *vs.* AR $p = 0,0032$) (Figura 10E). Hubo un 68,97 % de sujetos C con valores no detectables de IL-8, 53,33 % en pacientes ANA, 56,67 % en pacientes AA y 46,15 % en pacientes AR. Al realizar el análisis más detallado, comparando los pacientes de diagnóstico grave con los de diagnóstico moderado-leve dentro de cada grupo de sujetos asmáticos (ANA y AA) (Figura 11E), se observaron mayores niveles de IL-8 en los pacientes con asma grave, aunque estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas ($505,49 \pm 387,80$ pg/ml en sujetos con ANA grave y $377,79 \pm 338,27$ pg/ml en pacientes con ANA moderada-leve; $342,91 \pm 406,96$ pg/ml en sujetos con AA

grave y $48,47 \pm 69,77$ pg/ml en pacientes con AA moderada-leve). A pesar de la falta de significación, destacamos los mayores niveles de IL-8 en pacientes ANA ($452,28 \pm 357,72$ pg/ml) respecto a los pacientes AA ($207,02 \pm 328,90$ pg/ml) y la tendencia a que los pacientes asmáticos más graves de las dos condiciones patológicas tengan niveles mayores que los pacientes con clínica moderada-leve. Finalmente, al comparar los subfenotipos clínicos de gravedad entre los pacientes con asma, también encontramos que los pacientes con ANA moderada-leve tenían una expresión proteica de IL-8 significativamente mayor que los AA moderados-leves ($p= 0,0433$).

El estudio de CHI3L1 demostró que todos los sueros tenían niveles detectables de esta proteína. Las mayores concentraciones de CHI3L1 en suero se encontraron en los pacientes con AA ($22.812,55 \pm 3.573,46$ pg/ml), seguido de los pacientes con AR ($20.253,79 \pm 10.823,87$ pg/ml), pacientes con ANA ($19.364,77 \pm 9.046,25$ pg/ml) y finalmente, los niveles más bajos se encontraron en el grupo C ($15.729,18 \pm 8.576,85$ pg/ml), encontrándose solo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y el grupo de pacientes AA ($p= 0,0001$) (Figura 10G). Analizando los pacientes en función de la gravedad dentro de los grupos con asma, no se encontraron diferencias significativas ($17.026,99 \pm 4.845,20$ pg/ml sujetos con ANA grave y $21.702,56 \pm 11.589,97$ pg/ml pacientes con ANA moderada-leve; $22.708,69 \pm 4.301,77$ pg/ml sujetos AA grave y $22.916,40 \pm 2.814,77$ pg/ml pacientes AA moderados-leves), como muestra la Figura 11G. Sin embargo, sí hubo diferencias entre el grupo C y los subgrupos de pacientes con AA grave y AA moderada-leve (C *vs.* AA grave $p= 0,005$, C *vs.* AA moderada-leve $p= 0,03$), siendo en los sujetos sanos la expresión proteica de CHI3L1 menor. A su vez, los pacientes con ANA grave mostraron menores niveles de CHI3L1 que los pacientes con AA grave ($p= 0,0021$).

En general, los niveles de proteína de POSTN, que se reflejan en las Figuras 10I y 11I, fueron más altos en el grupo ANA ($18.679,59 \pm 8.086,07$ pg/ml), tanto en los pacientes graves (ANA grave: $20.198,91 \pm 7.859,24$ pg/ml) como en los moderados-leves (ANA moderada-leve: $17.160,28 \pm 7.930,59$ pg/ml) cuando se comparan con los niveles del grupo C ($15.487,71 \pm 6.532,85$ pg/ml), pero solo en los pacientes con ANA grave hubo diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,0389$) (Figura 10I). Los niveles del grupo ANA también fueron más altos que los otros dos grupos de enfermos (AA: $15.199,93 \pm 4.263,88$ pg/ml y AR: $11.190,29 \pm 2.310,13$ pg/ml), con diferencias estadísticamente significativas (ANA *vs.* AA $p= 0,0415$, ANA *vs.* AR $p=0,0016$). Los pacientes con AR fueron los que menor nivel de POSTN mostraron, siendo sus diferencias estadísticamente significativas no solo con el grupo ANA, sino también con el resto de grupos (C *vs.* AR, $p= 0,0219$ y AA *vs.* AR, $p= 0,0021$). Al comparar los pacientes en función de la gravedad (Figura 11I) se observó un mayor nivel de POSTN en los pacientes ANA grave que

los pacientes AA grave ($15.305,71 \pm 4.607,65$ pg/ml, $p= 0,0468$). Todos los sujetos del estudio tuvieron niveles detectables de POSTN.

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en el resto de las proteínas estudiadas, se observaron ciertas diferencias, principalmente al analizar los niveles de PHLDA1 (Figuras 10D y 11D) e IL-10 (Figuras 10F y 11F), en función de la gravedad de los grupos de estudio. Específicamente, PHLDA1 mostró los niveles relativos de proteína más altos en los pacientes con ANA ($0,062 \pm 0,064$ CR) respecto a los otros grupos (C: $0,035 \pm 0,04$ CR, AA: $0,025 \pm 0,027$ CR, AR: $0,032 \pm 0,036$ CR) y los mayores niveles, en los pacientes con ANA moderada-leve ($0,08 \pm 0,10$ CR). En la Figura 14 se muestra un ejemplo representativo de los resultados del *western blot* de PHLDA1. Por el contrario, los mayores niveles de IL-10 se encontraron en los pacientes con AA ($194,96 \pm 171,81$ pg/ml), seguido de los pacientes AR ($164,82 \pm 126,41$ pg/ml), los pacientes con ANA ($157,27 \pm 170,82$ pg/ml) y finalmente, con los niveles más bajos, el grupo C ($123,38 \pm 120,61$ pg/ml) (Figura 10F). Hay que destacar que hubo un alto porcentaje de sueros con niveles no detectables de IL-10 en casi todos los grupos: 70 % en C, 63,33 % en pacientes ANA, 30 % en pacientes AA y 71,43 % en pacientes AR. El análisis de esta proteína agrupando los sujetos asmáticos por gravedad (Figura 11F) mostró también una tendencia que parece indicar que los mayores niveles de proteína se encuentran en los grupos de pacientes con asma más grave: ANA grave ($200,60 \pm 219,85$ pg/ml) *vs.* ANA moderada-leve ($105,27 \pm 79,62$ pg/ml); AA grave ($211,49 \pm 193,94$ pg/ml) *vs.* AA moderada-leve ($168,11 \pm 136,13$ pg/ml).

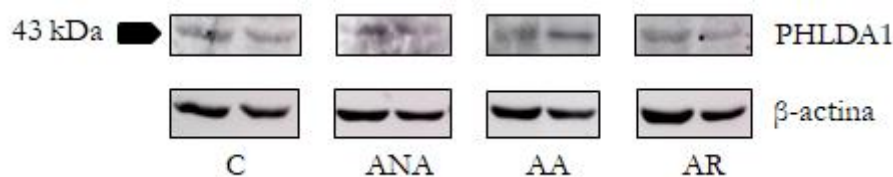


Figura 14: Ejemplo representativo del resultado de un *western blot* de PHLDA1. Se muestran los resultados de 2 sujetos C y 2 pacientes de cada grupo clínico: ANA, AA y AR. La flecha indica la masa molecular del marcador más próximo a la banda de reconocimiento del anticuerpo monoclonal utilizado, según se especifica en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos.

Finalmente, la proteína PI3 (Figuras 10H y 11H), que fue detectable en todos los sueros del estudio, no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones, pero como muestra la gráfica de la Figura 10H, se observa una tendencia hacia un incremento de expresión en los pacientes AR comparado con el resto (C: $6.056,30 \pm 2.535,85$ pg/ml, ANA: $6.031,50 \pm 2.288,51$ pg/ml, AA: $6.587,17 \pm 2.238,71$ pg/ml y AR: $7.517,22 \pm 3.167,27$ pg/ml).

4.2. Análisis de sensibilidad y especificidad por curvas ROC

Para definir la validez discriminatoria de los potenciales biomarcadores estudiados, se realizaron análisis de curvas ROC (cuantitativo, que nos permite definir un umbral idóneo de discriminación, y cualitativo) de la expresión proteica con el fin de catalogar las proteínas analizadas como idóneas o no, para diferenciar los distintos grupos de estudio, en función de su valor de AUC. Las comparaciones realizadas, así como los criterios de significación, se detallan en el apartado 11 de Materiales y Métodos.

4.2.1. Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos y grupo control y entre cada fenotipo asmático, en función de la gravedad

El análisis de curvas ROC se realizó de forma individual o en combinación de dos o tres biomarcadores.

4.2.1.1. Análisis de biomarcadores individuales

La Tabla 19 resume los datos obtenidos del análisis por curvas ROC de la población P1, estudiando los marcadores proteicos de forma individual. A continuación se realizaron los análisis de curvas ROC para el estudio de discriminación de los fenotipos clínicos del grupo control y el estudio de los subgrupos de gravedad del asma entre sí, de cada grupo clínico.

4.2.1.1.1. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo control

En el análisis del grupo de pacientes ANA *vs.* los sujetos C (Tabla 19A), los mejores marcadores diferenciales fueron la banda inferior de MSR1 y SERPINB2, que podrían discriminar la enfermedad ANA de los sujetos C de forma muy buena (banda inferior de MSR1: AUC de 0,96 y umbral de 0,148CR; SERPINB2: AUC de 0,91 y umbral de 0,404 CR). El resto de las proteínas analizadas, se clasificaron como biomarcadores regulares o pobres, en base a los valores de AUC.

Se observa el mismo comportamiento (pero con distintos valores en el umbral de discriminación) al comparar el grupo C y los pacientes con ANA grave. Los mejores resultados de discriminación fueron también los obtenidos para la banda inferior de MSR1 y SERPINB2 (ambas con valores de AUC de 0,93, y con umbrales de 0,137 CR, para la banda inferior de MSR1 y de 0,359 CR, para SERPINB2). Sin embargo, para la comparación del grupo C frente a pacientes con ANA moderada-leve, la banda inferior de MSR1 mejoró su poder de discriminación, con un resultado excelente (AUC: 1, umbral: 0,148 CR) y SERPINB2, aunque se clasificó como bueno, tuvo un valor de AUC ligeramente menor que en las dos comparaciones anteriores (AUC: 0,89, umbral:

0,404 CR). El resto de las proteínas fueron regulares o pobres para la discriminación entre grupos de gravedad y sujetos control. IL-10, en el grupo ANA y el grupo ANA moderado-leve, no entró dentro de ninguna categoría según nuestros criterios. Además, PHLDA1 no se pudo clasificar en ningún criterio: en el grupo total de sujetos con ANA el valor AUC fue inferior a 0,50 y en el caso de los subgrupos por gravedad de asma, no hubo suficientes datos.

La Tabla 19B muestra los resultados del grupo AA. Para este grupo, los marcadores SERPINB2 (AUC: 0,97 y umbral: 0,375 CR), CHI3L1 (AUC: 0,78 y umbral: 20.065 pg/ml) e IL-8 (AUC: 0,76 y umbral: 64 pg/ml) serían muy buenas o buenas propuestas para discriminar la enfermedad AA de los sujetos C. En esta población, MSR1 no se estudió y PHLDA1, debido al bajo número de pacientes con valores detectables, solo se analizó en la población total de pacientes AA y en todo caso fue clasificado como pobre. El resto de biomarcadores fueron regulares o pobres para discriminar estos pacientes.

Al analizar por separado los pacientes agrupados por su gravedad, encontramos que CHI3L1 (AUC: 0,72 y umbral: 20.202 pg/ml) y SERPINB2 (AUC: 0,77 y umbral: 0,086 CR) serían buenos biomarcadores para discriminar el grupo C frente a AA grave. Para discriminar controles sanos de pacientes con AA moderada-leve, SERPINB2 aparece como un biomarcador excelente (AUC: 1 y umbral: 0,097 CR), mientras que CHI3L1 podría ser bueno (AUC: 0,78 y umbral: 14.426 pg/ml).

Para el grupo de pacientes con alergia sin asma (AR), IL-8 fue el único marcador que permite discernir este fenotipo clínico de los sujetos sanos, con una categorización de bueno (AUC: 0,78, umbral: 627 pg/ml). El resto de proteínas estudiadas caen en la categoría regular, salvo MSR1 que no se estudió. Además, el resultado del análisis de PHLDA1 no entró en ninguna categoría ($AUC < 0,50$) e IL-10 no se pudo analizar por falta de datos (Tabla 19C).

4.2.1.1.2. Comparación entre los subgrupos de gravedad del asma

La Tabla 19 también muestra las comparaciones de los subgrupos de gravedad de los dos fenotipos con asma. En la Tabla 19A, se observa que la comparación entre subgrupos de gravedad permitió definir a IL-8 como un buen candidato (AUC: 0,76, umbral: 841 pg/ml) para diferenciar el ANA moderada-leve del grave. Por otro lado, los mejores biomarcadores para discriminar AA moderada-leve de AA grave, fueron IL-8 y SERPINB2, clasificados ambos como buenos para la discriminación de la gravedad del asma (IL-8: AUC de 0,82 y umbral de 17 pg/ml; SERPINB2: AUC de 0,77 y umbral de 0,095 CR) (Tabla 19B). Para ambos fenotipos, el resto de proteínas o se clasificaron como regulares o pobres o no se pudo determinar su categoría por falta de datos.

Tabla 19: Clasificación y categorización de los biomarcadores a nivel de expresión proteica por el análisis de curvas ROC. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo C

A. Grupo ANA

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC: 0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50-0,60)
C <i>vs.</i> ANA		MSR1inf: 0,96 SERPINB2: 0,91		POSTN: 0,62	CHI3L1: 0,60 IL-8: 0,50 IL-10< 0,50 PHLDA1< 0,50 PI3: 0,50 MSR1sup: 0,60
C <i>vs.</i> ANA G		MSR1inf: 0,93 SERPINB2: 0,93		CHI3L1: 0,63 IL-8: 0,62	IL-10: 0,56 PI3: 0,52 PHLDA1: ND POSTN: 0,55 MSR1sup: 0,60
C <i>vs.</i> ANA ML	MSR1inf: 1		SERPINB2: 0,89	IL-8: 0,62 POSTN: 0,69	CHI3L1: 0,66 IL-10< 0,50 PI3: 0,51 PHLDA1: ND MSR1sup: 0,60
ANA ML <i>vs.</i> ANA G			IL-8: 0,76	CHI3L1: 0,62 POSTN: 0,65 SERPINB2: 0,70	IL-10< 0,50 PI3: 0,55 PHLDA1: ND MSR1inf: 0,55 MSR1sup< 0,50

B. Grupo AA

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50 -0,60)
C <i>vs.</i> AA		SERPINB2: 0,97	CHI3L1: 0,78 IL-8: 0,76		IL-10< 0,50 PHLDA1: 0,50 PI3< 0,50 POSTN: 0,51
C <i>vs.</i> AA G			CHI3L1: 0,72 SERPINB2: 0,77	POSTN: 0,62	IL-8: 0,52 IL-10< 0,50 PHLDA1: ND PI3< 0,50
C <i>vs.</i> AA ML	SERPINB2: 1		CHI3L1: 0,78		IL-8: 0,59 IL-10< 0,50 PHLDA1: ND PI3< 0,50 POSTN: 0,52
AA ML <i>vs.</i> AA G			IL-8: 0,82 SERPINB2: 0,77		CHI3L1: 0,50 IL-10< 0,50 PI3: 0,56 PHLDA1: ND POSTN: 0,52

C. Grupo AR

COMPARACIÓN	EXCELENTE (AUC:0,98-1)	MUY BUENO (AUC:0,91-0,97)	BUENO (AUC:0,76-0,90)	REGULAR (AUC:0,61-0,75)	POBRE (AUC:0,50 -0,60)
C <i>vs.</i> AR			IL-8: 0,78	CHI3L1: 0,63 PI3: 0,68 POSTN: 0,74 SERPINB2: 0,70	PHLDA1< 0,50 IL-10: ND

A) Clasificación del grupo ANA. B) Clasificación del grupo AA. C) Clasificación del grupo AR. Los genes con valores AUC< 0,50 o que por falta de datos no se pudo determinar (ND) se incluyen en la columna denominada pobre. AUC: área bajo la curva. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1.

4.2.1.2. *Análisis de biomarcadores combinados*

Debido a los pobres resultados obtenidos en el análisis de muchos de los potenciales biomarcadores proteicos de forma individual, se realizó un estudio, siguiendo el mismo esquema que en el análisis individual, en el que se combinaron dos y tres proteínas a la vez, para comprobar si se obtenían mejoras de la especificidad y sensibilidad para alguna discriminación. A continuación se resaltan las combinaciones de proteínas en las que hubo una mejora en los valores AUC combinados con respecto a los valores AUC individuales.

4.2.1.2.1. **Estudio de discriminación combinando dos biomarcadores**

Se realizarán los análisis de curvas ROC combinando dos biomarcadores para el estudio de discriminación entre los fenotipos clínicos y el grupo control, así como en el estudio de los subgrupos de gravedad del asma entre sí (ANA moderada-leve *vs.* ANA grave y AA moderada-leve *vs.* AA grave).

4.2.1.2.1.1. *Comparación entre fenotipos clínicos y grupo control*

Los resultados del análisis de combinación de la expresión proteica de dos biomarcadores se resumen en la Tabla 20. La combinación de dos marcadores para la discriminar el grupo ANA respecto al grupo C (Tabla 20A) mejoró la sensibilidad y especificidad (sinergia) notablemente para el caso de CHI3L1 y la banda superior de MSR1, cuyos valores AUC individuales fueron pobres (AUC: 0,60, umbrales 13.064 pg/ml y 0,208 CR, respectivamente) y sin embargo, al combinarse, su clasificación mejoró a test bueno (AUC combinado: 0,78). Algo similar ocurre en la combinación de POSTN con PHLDA1 (AUC individuales: 0,62 y 0,42, respectivamente; AUC combinado: 0,82; umbrales 13.633 pg/ml y 0,011 CR, respectivamente). También destacable fue la combinación de las dos bandas de MSR1 (AUC de la banda inferior de 0,96 y de la banda superior 0,60) cuyo valor AUC fue 1 (categoría excelente y umbrales 0,148 y 0,208 CR, respectivamente). Algunas de las combinaciones no se pudieron realizar por falta de datos.

Tabla 20: Valores AUC del análisis de curvas ROC combinando la expresión proteica de dos biomarcadores.

Tabla 20A. Grupo ANA comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	MSR1sup	MSR1inf	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,60	0,48	0,67	0,59	0,63	0,78	0,97	0,70	0,92
IL-10	-	0,42	ND	0,59	0,47	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,50	0,61	0,74	ND	ND	ND	ND
PI3	-	-	-	0,50	0,67	0,63	0,96	0,47	0,91
POSTN	-	-	-	-	0,62	0,73	0,96	0,82	0,95
MSR1sup	-	ND	ND	-	-	0,60	1	ND	ND
MSR1inf	-	ND	ND	-	-	-	0,96	ND	ND
PHLDA1	-	ND	ND	-	-	ND	ND	0,42	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	0,91

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. ND: no determinado debido a falta de datos.

Al estudiar los resultados de este grupo de pacientes en función de la gravedad (Tabla 20B, C y H), también encontramos mejoras importantes en los valores de AUC. En la comparación de sujetos con ANA moderada-leve y el grupo C, hubo proteínas con fuertes sinergias como CHI3L1 + banda superior MSR1 (AUC individuales: 0,56 y 0,60, respectivamente; AUC combinado: 0,83; umbrales 13.064 pg/ml y 0,208 CR, respectivamente), CHI3L1 + SERPINB2 (AUC combinado: 0,97; AUC y umbral de SERPINB2: 0,89 y 0,404 CR), IL-8 + PI3 (AUC individuales: 0,62 y 0,51, respectivamente; AUC combinado: 0,76; umbrales 677 y 3.074 pg/ml, respectivamente), IL-8 + POSTN (AUC combinado: 0,87; AUC y umbral de POSTN: 0,69 y 15.787 pg/ml), POSTN + SERPINB2 (AUC combinado: 0,97), y POSTN + banda superior MSR1 (AUC combinado: 0,81; AUC y umbral de MSR1: 0,60 y 0,208 CR). La mayoría de marcadores pasan de tener una clasificación mediocre a tener una buena o muy buena en combinación.

Tabla 20B. Grupo ANA moderado-leve comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	MSR1sup	MSR1inf	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,56	0,41	0,63	0,56	0,70	0,83	ND	ND	0,97
IL-10	-	0,41	ND	0,67	0,63	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,62	0,76	0,87	ND	ND	ND	ND
PI3	-	-	-	0,51	0,69	0,61	ND	ND	0,89
POSTN	-	-	-	-	0,69	0,81	ND	ND	0,97
MSR1sup	-	ND	ND	-	-	0,60	ND	ND	ND
MSR1inf	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,48	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	0,89

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. ND: no determinado debido a falta de datos.

En la discriminación de los sujetos con ANA grave respecto al grupo C (Tabla 20C), la mejora de los valores de AUC se observó en la combinación de la banda superior de MSR1 (AUC individual: 0,60 y umbral 0,254 CR) con la banda inferior de MSR1 (AUC individual: 0,93), o con CHI3L1 (AUC individual: 0,63 y umbral 14.367 pg/ml) (AUC combinado: 1 y AUC combinado: 0,76 , respectivamente); y de POSTN (AUC individual: 0,55) con SERPINB2 (AUC individual: 0,93) (AUC combinado: 0,97; umbrales 13.633 pg/ml y 0,359 CR, respectivamente).

Tabla 20C. Grupo ANA grave comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	MSR1sup	MSR1inf	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,63	0,62	0,67	0,63	0,64	0,76	0,94	ND	0,93
IL-10	-	0,56	ND	0,51	0,60	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,62	0,46	0,57	ND	ND	ND	ND
PI3	-	-	-	0,52	0,65	0,64	0,95	ND	0,93
POSTN	-	-	-	-	0,55	0,66	0,93	ND	0,97
MSR1sup	-	ND	ND	-	-	0,60	1	ND	ND
MSR1inf	-	ND	ND	-	-	-	0,93	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,48	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	0,93

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. ND: no determinado debido a falta de datos.

En la Tabla 20D se resumen los resultados de las curvas ROC para las combinaciones de biomarcadores analizadas para discriminar el grupo AA del grupo C. Se observó cómo la combinación de CHI3L1 (AUC individual: 0,78 y umbral 20.065 pg/ml) con IL-8 (AUC individual: 0,76 y umbral 64 pg/ml) o SERPINB2 (AUC individual: 0,97 y umbral 0,375 CR) mejoraba en gran medida la capacidad de discernir entre este fenotipo clínico y el sano, convirtiéndose en un test muy bueno (AUC combinado: 0,92) o excelente (AUC combinado: 1), respectivamente. Importantes también fueron las sinergias entre IL-10 (AUC individual: 0,37) con POSTN (AUC individual: 0,51) y POSTN con PHLDA1 (AUC individual: 0,50), cuyos valores individuales les clasificaban como test pobres, pero al combinarse se convertían en buenos (IL-10 + POSTN con AUC combinado 0,85 y umbrales 101,40 y 13.544 pg/ml, respectivamente; POSTN + PHLDA1 con AUC combinado 0,79 y umbrales 13.544 pg/ml y 0,005 CR, respectivamente).

Tabla 20D. Grupo AA comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,78	0,63	0,92	0,78	0,79	0,75	1
IL-10	-	0,37	ND	0,63	0,85	ND	ND
IL-8	-	ND	0,76	0,63	0,74	ND	ND
PI3	-	-	-	0,44	0,56	0,58	0,97
POSTN	-	-	-	-	0,51	0,79	0,95
PHLDA1	-	ND	ND	-	-	0,50	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	0,97

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla.

En los análisis por gravedad, CHI3L1 (AUC individual: 0,78) también tuvo un papel importante para diferenciar los pacientes con asma alérgica moderada-leve (Tabla 20E) de los sujetos sanos, al combinarse de nuevo con IL-8 (AUC individual: 0,59) (AUC combinado: 0,87; umbrales 14.426 y 121pg/ml, respectivamente). Es destacable la combinación de IL-10 (AUC 0,36 y umbral 101,40 pg/ml) con POSTN (AUC 0,52 y umbral 7.067pg/ml) que se clasificó como test bueno (AUC combinado: 0,83).

Tabla 20E. Grupo AA moderado-leve comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,78	0,68	0,87	0,78	0,78	ND	1
IL-10	-	0,36	ND	0,62	0,83	ND	ND
IL-8	-	ND	0,59	0,63	0,54	ND	ND
PI3	-	-	-	0,46	0,53	ND	ND
POSTN	-	-	-	-	0,52	ND	ND
PHLDA1	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	-	ND	ND	ND	ND	ND	1

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla.

La discriminación de los pacientes AA graves del grupo control fue excelente con la combinación de CHI3L1 (AUC individual: 0,72) con IL-8 (AUC individual: 0,52) (AUC: 1; umbrales 20.202 y 122 pg/ml, respectivamente). Además destacan otras 7 combinaciones que se recalcan en la Tabla 20F por mejorar su capacidad individual para discernir estos grupos de sujetos.

Tabla 20F. Grupo AA grave comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,72	0,60	1	0,80	0,80	ND	ND
IL-10	-	0,45	ND	0,62	0,86	ND	ND
IL-8	-	ND	0,52	0,95	0,95	ND	ND
PI3	-	-	-	0,46	0,58	ND	0,93
POSTN	-	-	-	-	0,62	ND	0,97
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	ND	ND	ND	-	-	ND	0,77

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla.

Por último, se analizaron las combinaciones de las 9 proteínas para discriminar el grupo AR de los sujetos controles (Tabla 20G). La combinación de CHI3L1 (AUC individual: 0,63) con IL-8 (AUC individual: 0,78) tuvo una sinergia excelente (AUC combinado: 1; umbrales 9.953 y 627 pg/ml, respectivamente). El resto de combinaciones destacables (un total de 5) fueron test buenos para discriminar este fenotipo clínico del grupo control y se resaltan en la tabla.

Tabla 20G. Grupo AR comparado con el grupo C

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,63	ND	1	0,68	0,75	0,64	0,70
IL-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,78	0,87	0,90	ND	ND
PI3	-	ND	-	0,68	0,80	0,73	0,83
POSTN	-	ND	-	-	0,74	0,39	0,80
PHLDA1	-	ND	-	-	-	0,48	ND
SERPINB2	-	ND	-	-	-	ND	0,70

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla.

En general, se pudo observar cómo el hecho de combinar dos proteínas mejora la sensibilidad y especificidad de alguno de estos biomarcadores para discriminar los distintos grupos y la gravedad del asma dentro de la población P1.

4.2.1.2.1.2. Comparación entre los subgrupos de gravedad del asma

La Tabla 20H detalla los valores de AUC de las combinaciones de los biomarcadores para discriminar entre los sujetos con ANA moderada-leve y ANA grave. Si en el análisis individual, todos los biomarcadores excepto IL-8 (AUC: 0,76 y umbral 841 pg/ml) se clasificaron como regulares o pobres (valores AUC individuales entre 0,46 y 0,70), se puede observar que existen varias combinaciones que permiten una buena discriminación de estas dos condiciones clínicas. Destacan la combinación de SERPINB2 + POSTN (AUC individuales: 0,70 y 0,65, respectivamente; AUC combinado: 0,90; umbrales 0,132 CR y 17.419 pg/ml, respectivamente), además de CHI3L1 + POSTN (AUC individuales: 0,62 y 0,65, respectivamente; AUC combinado: 0,77; umbrales 18.500 y 17.419 pg/ml, respectivamente) e IL-10 + POSTN (AUC individuales: 0,47 y 0,65, respectivamente; AUC combinado: 0,77; umbrales 105,200 y 17.419 pg/ml, respectivamente).

Tabla 20H. Grupo ANA moderado-leve comparado con el grupo ANA grave

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	MSR1sup	MSR1inf	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,62	0,43	0,76	0,56	0,77	0,68	0,65	ND	0,63
IL-10	-	0,47	ND	0,63	0,77	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,76	0,82	0,78	ND	ND	ND	ND
PI3	-	-	-	0,55	0,57	0,60	0,60	ND	0,73
POSTN	-	-	-	-	0,65	0,64	0,62	ND	0,90
MSR1sup	-	ND	ND	-	-	0,46	0,55	ND	ND
MSR1inf	-	ND	ND	-	-	-	0,55	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	0,70

Tabla 20I. Grupo AA moderado-leve comparado con el grupo AA grave

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,50	0,47	0,82	0,58	0,50	ND	0,90
IL-10	-	0,46	ND	0,65	0,62	ND	ND
IL-8	-	ND	0,82	0,78	0,84	ND	ND
PI3	-	-	-	0,56	0,54	ND	0,87
POSTN	-	-	-	-	0,52	ND	0,93
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	0,77

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. Las celdas con un guion se refieren a que la comparación ya se muestra en otra celda de esa misma tabla. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. ND: no determinado debido a falta de datos.

Para diferenciar pacientes con AA moderada-leve de grave, se resaltan en la Tabla 20I las combinaciones más relevantes. Destacan POSTN (AUC individual: 0,52 y umbral 19.119 pg/ml) con SERPINB2 (AUC individual: 0,77 y umbral 0,095 CR), cuya fuerte sinergia transforma biomarcadores con clasificación individual pobre y buena, respectivamente, en una clasificación

combinada muy buena (AUC combinado: 0,93). También se observó la importancia de otras combinaciones con este último biomarcador como SERPINB2 + CHI3L1 (AUC individual: 0,50) (AUC combinada: 0,90; umbrales 0,095 CR y 24.144 pg/ml, respectivamente) y SERPINB2 + PI3 (AUC individual: 0,56) (AUC combinado: 0,87; umbrales 0,095 CR y 5.524 pg/ml, respectivamente).

4.2.1.2.2. Estudio de discriminación combinando tres biomarcadores

Siguiendo el mismo esquema del Apartado 4.2.2. de Resultados, se destacan las combinaciones de 3 biomarcadores que experimentan mejoras respecto a los valores AUC individuales en las comparaciones entre fenotipos clínicos y el grupo control y en las comparaciones de los subgrupos de gravedad del asma.

4.2.1.2.2.1. Comparación entre fenotipos clínicos y grupo control

La Tabla 21 resume los resultados del análisis por curvas ROC de la combinación de tres marcadores según su expresión proteica. Esta tabla, al compararla con los análisis resumidos en las Tablas 19 y 20, demuestra el hecho de que al combinar tres proteínas, se mejora de nuevo la sensibilidad y especificidad de algunos de los biomarcadores. Estos análisis dieron lugar a resultados interesantes, con valores AUC mayores de 0,75, lo que quiere decir que con estas combinaciones, se encontraron test buenos, muy buenos o excelentes para discriminar asma (y su gravedad) o alergia. Algunas de las combinaciones no se pudieron realizar por falta de datos.

En el caso del grupo ANA comparado con el grupo C (Tabla 21A), hubo un efecto sinérgico para los 3 biomarcadores implicados en las siguientes combinaciones: CHI3L1 + PI3 + banda superior MSR1 (AUC individual: 0,60, 0,50 y 0,60, respectivamente; AUC combinado: 0,77; umbrales 13.064 pg/ml, 6.528 pg/ml y 0,208 CR, respectivamente); CHI3L1 + POSTN + banda superior MSR1 (AUC combinado: 0,83; AUC y umbral de POSTN: 0,62 y 13.633 pg/ml); CHI3L1 + POSTN + PHLDA1 (AUC combinado: 0,78; AUC y umbral de PHLDA1: 0,42 y 0,011 CR); PI3 + POSTN + banda superior MSR1 (AUC combinado: 0,77; AUC y umbral de PI3: 0,50 y 6.528 pg/ml); y PI3 + POSTN + PHLDA1 (AUC combinado: 0,78).

El análisis de combinación de 3 marcadores para la discriminación de los pacientes ANA moderados-leves del grupo C mostró 7 combinaciones interesantes que se recalcan en negrita en la Tabla 21A.

En el análisis de los pacientes con ANA grave vs. el grupo C, también se encontraron sinergias interesantes entre 3 biomarcadores, que mejoraron la capacidad de discernir estos grupos con

buenos valores de AUC (Tabla 21A). Esto se observó en las combinaciones de CHI3L1 (AUC individual 0,63 y umbral de 14.367 pg/ml) e IL-8 (AUC individual 0,62 y umbral de 262 pg/ml) con PI3 (AUC individual 0,52 y umbral de 6.528 pg/ml) (AUC combinado: 0,79); de CHI3L1 y POSTN (AUC individual 0,55 y umbral de 13.633 pg/ml) con la banda superior de MSR1 (AUC individual 0,60 y umbral de 0,254 CR) (AUC combinado: 0,76); y de PI3 y POSTN (AUC individual 0,55 y umbral de 13.633 pg/ml) con la banda superior de MSR1 (AUC individual 0,60 y umbral 0,254 CR) (AUC combinado: 0,77).

Tabla 21: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores

Tabla 21A. Grupo ANA comparado con el grupo C

Combinación de marcadores	Valor AUC ANA	Valor AUC ANA ML	Valor AUC ANA G
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0,59	0,67	0,64
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,53	0,63	0,64
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,67	0,79	0,79
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,72	0,87	0,67
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,66	0,68	0,62
CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior	0,77	0,83	0,64
CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior	0,97	ND	0,95
CHI3L1 + PI3 + PHLDA1	0,70	ND	ND
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0,92	ND	0,93
CHI3L1 + POSTN + MSR1 superior	0,83	0,88	0,76
CHI3L1 + POSTN + MSR1 inferior	0,97	ND	0,94
CHI3L1 + POSTN + PHLDA1	0,78	ND	ND
CHI3L1 + POSTN + SERPINB2	0,94	ND	ND
IL-10 + PI3 + POSTN	0,57	0,61	0,60
IL-8 + PI3 + POSTN	0,75	0,84	0,62
PI3 + POSTN + MSR1 superior	0,77	0,81	0,77
PI3 + POSTN + MSR1 inferior	0,97	ND	0,96
PI3 + POSTN + PHLDA1	0,78	ND	ND
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,94	0,97	ND

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. ND: combinaciones que no se pudieron hacer por falta de datos. ANA: Población total de pacientes con asma no alérgica. ANA ML: grupo de sujetos con ANA moderada-leve. ANA G: grupo de sujetos con ANA grave.

Para la discriminación del grupo AA frente al C (Tabla 21B) destacan las combinaciones de CHI3L1 (AUC individual: 0,78 y umbral de 20.065 pg/ml) e IL-8 (AUC individual: 0,76 y umbral de 65 pg/ml) con PI3 (AUC individual: 0,44 y umbral de 8.196 pg/ml) (AUC combinado: 0,92); o con POSTN (AUC individual: 0,51 y umbral de 13.544 pg/ml) (AUC combinado: 0,91), que obtuvieron valores de AUC combinados que les clasifica en la categoría de test muy bueno. Otras combinaciones buenas que mejoraban la sensibilidad y especificidad individual fueron la de IL-10

+ PI3 + POSTN (AUC individuales: 0,37, 0,44 y 0,51, respectivamente; AUC combinado: 0,86; umbrales: 101,400, 8.196 y 13.544 pg/ml, respectivamente), y la de PI3 + POSTN + PHLDA1 (AUC individuales: 0,44, 0,51 y 0,50, respectivamente; AUC combinado: 0,79; umbrales: 8.196 pg/ml, 13.544 pg/ml y 0,005 CR, respectivamente).

La combinación de tres marcadores para discriminar los pacientes con AA moderada-leve de los sujetos del grupo C (Tabla 21B) que sufrió una mejora relevante en los valores AUC individuales fue el análisis de IL-10 con PI3 y POSTN, cuyos valores AUC individuales fueron 0,37, 0,44 y 0,51, respectivamente (categorías pobres) y juntos, proporcionan un test bueno, con un valor de AUC de 0,85 (umbrales: 101,40, 8.196 y 13.544 pg/ml, respectivamente).

Esta misma combinación de biomarcadores, pero con distintos umbrales (umbral de IL-10 457,40 pg/ml, de PI3 3.269 pg/ml y de POSTN 22.785 pg/ml), permite discernir los pacientes con AA grave de los sujetos sanos (AUC combinado: 0,89). Además, para esta comparación destaca también la combinación de IL-8 (AUC individual 0,76 y umbral 122 pg/ml), PI3 (AUC individual 0,44 y umbral 3.269 pg/ml) y POSTN (AUC individual 0,51 y umbral 22.785 pg/ml), con un valor AUC combinado de 0,94 (categoría muy buena) (Tabla 21B).

Tabla 21B. Grupo AA comparado con el grupo C

Combinación de marcadores	Valor AUC AA	Valor AUC AA ML	Valor AUC AA G
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0,71	0,68	0,72
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,83	0,82	0,86
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,92	0,89	ND
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,91	0,86	ND
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,78	0,78	0,81
CHI3L1 + PI3 + PHLDA1	0,75	ND	ND
CHI3L1 + POSTN + PHLDA1	0,71	ND	ND
IL-10 + PI3 + POSTN	0,86	0,85	0,89
IL-8 + PI3 + POSTN	0,67	0,65	0,94
PI3 + POSTN + PHLDA1	0,79	ND	ND
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,97	ND	ND

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. ND: combinaciones que no se pudieron hacer por falta de datos. AA: Población total de pacientes con asma alérgica. AA ML: grupo de sujetos con AA moderada-leve. AA G: grupo de sujetos con AA grave.

En la comparación de los pacientes con AR respecto del grupo C destacaron 5 combinaciones de tres biomarcadores que fueron capaces de discernir estos grupos con buenos valores de AUC. Estas se resaltan en negrita en la Tabla 21C.

Tabla 21C. Grupo AR comparado con el grupo C

Combinación de marcadores	Valor AUC AR
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,80
CHI3L1 + PI3 + PHLDA1	0,75
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0,83
CHI3L1 + POSTN + PHLDA1	0,66
CHI3L1 + POSTN + SERPINB2	0,77
PI3 + POSTN + PHLDA1	0,82
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,90

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. ND: combinaciones que no se pudieron hacer por falta de datos. AR: Población total de pacientes con alergia sin asma.

4.2.1.2.2.2. Comparación entre los subgrupos de gravedad del asma

El análisis de la combinación de tres biomarcadores para discriminar sujetos con ANA moderada-leve de pacientes graves también se realizó y los resultados se resumen en la Tabla 21D. En este estudio se encontraron importantes mejoras respecto a los resultados individuales de ciertos biomarcadores. Destacamos 10 agrupamientos en negrita en la Tabla 21D que, salvo el de CHI3L1 + IL-8 + PI3 y el de IL-8 + PI3 + POSTN, el resto en combinación mejoran los valores AUC individuales. Es importante destacar la presencia casi permanente en estas combinaciones de POSTN.

Tabla 21D. Grupo ANA moderado-leve comparado con el grupo grave

Combinación de marcadores	Valor AUC
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0,63
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,77
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,88
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,98
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,76
CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior	0,78
CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior	0,68
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0,73
CHI3L1 + POSTN + MSR1 superior	0,80
CHI3L1 + POSTN + MSR1 inferior	0,80
CHI3L1 + MSR1 superior + MSR1 inferior	0,68
IL-10 + PI3 + POSTN	0,77
IL-8 + PI3 + POSTN	0,82
PI3 + POSTN + MSR1 superior	0,60
PI3 + POSTN + MSR1 inferior	0,60
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,93
PI3 + MSR1 superior + MSR1 inferior	0,60
POSTN + MSR1 superior + MSR1 inferior	0,62

Tabla 21E. Grupo AA moderado-leve comparado con el grupo grave.

Combinación de marcadores	Valor AUC
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0,65
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,63
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,82
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,84
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,56
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0,90
CHI3L1 + POSTN + SERPINB2	0,93
IL-10 + PI3 + POSTN	0,74
IL-8 + PI3 + POSTN	0,82
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,93

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. ND: combinaciones que no se pudieron hacer por falta de datos.

Al realizar el análisis en el que se comparaba AA moderada-leve con el grupo AA grave (Tabla 21E), se obtuvieron dos combinaciones importantes cuya unión mejoraba notablemente los valores AUC individuales de los marcadores. Estas combinaciones fueron las de CHI3L1 (AUC individual: 0,50 y umbral de 24.144 pg/ml) y SERPINB2 (AUC individual: 0,77 y umbral de 0,095 CR) o con PI3 (AUC individual: 0,56 y umbral de 5.524 pg/ml) (AUC combinado: 0,90), o con POSTN (AUC individual: 0,52 y umbral de 19.119 pg/ml) (AUC combinado: 0,93).

4.2.1.3. *Ranking del análisis por curvas ROC de la expresión proteica: comparaciones entre fenotipos clínicos y grupo control*

Analizando todos los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos por análisis de expresión proteica individual y combinada, se pudo establecer un *ranking* de los mejores biomarcadores o un panel de biomarcadores capaz de discriminar cada condición clínica con una precisión predictiva de al menos buena ($AUC > 0,75$). Estos *rankings* se muestran en la Tabla 22, en la que se resumen los mejores marcadores individuales y combinados de dos en dos o de tres en tres, para discernir las distintas enfermedades. A continuación se destacan los biomarcadores más relevantes, que fueron los que poseían mejor potencia estadística ($IC95 \% > 0,70$).

Para discriminar pacientes con ANA del grupo C, los resultados generaron muchas combinaciones óptimas con los 9 biomarcadores estudiados (Tabla 22A). Las mejores opciones como biomarcadores individuales fueron la banda inferior de MSR1 y SERPINB2, y como combinación de 2 biomarcadores hubo 4 combinaciones con resultados excelentes o muy buenos. Estas fueron 2 combinaciones de la banda inferior de MSR1 (con la banda superior de MSR1 o con CHI3L1) y 2 combinaciones de SERPINB2 (con POSTN o CHI3L1). Finalmente, se encontró 1 combinación de 3 biomarcadores con muy buen resultado de discriminación: PI3 con POSTN y la banda inferior de MSR1.

Tabla 22: Clasificación de los mejores biomarcadores proteicos individuales y combinados para cada comparación

Tabla 22A. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes ANA del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
MSR1inf	0,96 (0,89 – 1,00)	0,148
SERPINB2	0,91 (0,72 – 1,00)	0,404
MSR1inf + MSR1sup	1	0,148, 0,208
CHI3L1 + MSR1inf	0,97 (0,91 – 1,00)	13.064, 0,148
POSTN + SERPINB2	0,95 (0,85 – 1,00)	13.633, 0,404
CHI3L1 + SERPINB2	0,92 (0,77 – 1,00)	13.064, 0,404
POSTN + PHLDA1	0,82 (0,59 – 1,00)	13.633, 0,011
CHI3L1 + MSR1sup	0,78 (0,60 – 0,95)	13.064, 0,208
PI3 + POSTN + MSR1inf	0,97 (0,90 – 1,00)	6.528, 13.633, 0,148
CHI3L1 + POSTN + MSR1sup	0,83 (0,67 – 0,98)	13.064, 13.633, 0,208
PI3 + POSTN + MSR1sup	0,77 (0,58 – 0,96)	6.528, 13.633, 0,208

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con $AUC > 0,75$). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % ($IC95\%$) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Para la discriminación de los pacientes con ANA moderada-leve del grupo C, la lista de mejores biomarcadores se muestra en la Tabla 22B. Los biomarcadores individuales fueron los mismos que en la comparación del grupo total de ANA frente al C (aunque con umbrales distintos), pero el valor AUC clasifica a la banda inferior de MSR1 como test excelente (SERPINB2 fue test bueno). Recaltar aquí que SERPINB2 tuvo un IC95 % menor que 0,70, y como indicamos en el Apartado 11 de Materiales y Métodos, su relevancia como biomarcador en esta comparación disminuye. Hubo 3 combinaciones de dos biomarcadores con resultados importantes que los clasificaron como muy buenos o buenos para discernir estos pacientes de los sanos: 2 combinaciones de SERPIN2 (con CHI3L1 o POSTN) y 1 de IL-8 con POSTN. Por último, CHI3L1, IL-8 y POSTN fue la mejor combinación de 3 biomarcadores para esta discriminación de sujetos.

Tabla 22B. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes ANA moderados-leves del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
MSR1inf	1	0,148
SERPINB2	0,89 (0,66 – 1,00)	0,404
CHI3L1 + SERPINB2	0,97 (0,90 – 1,00)	13.064, 0,404
POSTN + SERPINB2	0,97 (0,90 – 1,00)	15.787, 0,404
IL-8 + POSTN	0,87 (0,70 – 1,00)	677, 15.787
CHI3L1 + MSR1sup	0,83 (0,63 – 1,00)	13.064, 0,208
POSTN + MSR1sup	0,81 (0,58 – 1,00)	15.787, 0,208
IL-8 + PI3	0,76 (0,50 – 1,00)	677, 3.074
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,87 (0,70 – 1,00)	13.064, 677, 15.787
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,79 (0,55 – 1,00)	13.064, 677, 3.074

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Para discernir los pacientes con ANA grave del grupo C se proponen la banda inferior de MSR1 y SERPINB2 como muy buenos biomarcadores individuales. La banda inferior de MSR1 destacó en las combinaciones de dos o con la banda superior de MSR1, con PI3, o con CHI3L1, como excelentes o muy buenos para esta discriminación. Dos combinaciones de 3 biomarcadores fueron relevantes estando presentes en las dos la banda inferior de MSR1 y PI3: en una se combinan con POSTN y en otra con CHI3L1 (Tabla 22C).

Tabla 22C. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes ANA grave del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
MSR1inf	0,93 (0,80 – 1,00)	0,137
SERPINB2	0,93 (0,78 – 1,00)	0,359
MSR1inf + MSR1sup	1	0,137, 0,254
POSTN + SERPINB2	0,97 (0,87 – 1,00)	13.633, 0,359
PI3 + MSR1inf	0,95 (0,85 – 1,00)	6.528, 0,137
CHI3L1 + MSR1inf	0,94 (0,83 – 1,00)	14.367, 0,137
CHI3L1 + MSR1sup	0,76 (0,50 – 1,00)	14.367, 0,254
PI3 + POSTN + MSR1inf	0,96 (0,88 – 1,00)	6.528, 13.633, 0,137
CHI3L1 + PI3 + MSR1inf	0,95 (0,86 – 1,00)	14.367, 6.528, 0,137
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,79 (0,56 – 1,00)	14.367, 262, 6.528
PI3 + POSTN + MSR1sup	0,77 (0,54 – 0,99)	6.528, 13.633, 0,254

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

En el caso de la enfermedad AA frente a la condición C, el biomarcador individual más importante fue SERPINB2, siendo excelente para esta discriminación. En las combinaciones relevantes de 2 biomarcadores, CHI3L1 destacó al unirse con SERPINB2 o con IL-8. Hubo una combinación de 3 biomarcadores destacable que fue IL-10 + PI3 + POSTN, cuya clasificación fue buena para discernir los pacientes AA de los sanos (Tabla 22D).

Tabla 22D. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes AA del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
SERPINB2	0,97 (0,90 – 1,00)	0,375
CHI3L1	0,78 (0,66 – 0,91)	20.065
IL-8	0,76 (0,56 – 0,97)	64
CHI3L1+SERPINB2	1	20.065, 0,375
CHI3L1 + IL-8	0,92(0,80 – 1,00)	20.065, 64
IL-10 + POSTN	0,85 (0,69 – 1,00)	101,4, 13.544
CHI3L1 + POSTN	0,79 (0,66 – 0,91)	20.065, 13.544
POSTN + PHLAD1	0,79 (0,51 – 1,00)	13.544, 0,005
IL-10+ PI3 +POSTN	0,86 (0,72 – 1,00)	101,4, 8.196, 13.544

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Para discriminar los pacientes con AA moderada-leve del grupo C, SERPINB2 y la unión de CHI3L1 + IL-8 + PI3 fueron las opciones con mejores resultados. La primera propuesta como un test excelente y la segunda combinación, como un test bueno para discriminar estos pacientes (Tabla 22E).

Tabla 22E. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes AA moderados-leves del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
SERPINB2	1	0,097
CHI3L1	0,78 (0,64 - 0,91)	14.426
CHI3L1 + IL-8	0,87 (0,68 - 1,00)	14.426, 121
IL-10 + POSTN	0,83 (0,66 - 1,00)	101,4, 7.067
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,89 (0,71 - 1,00)	14.426, 121, 6.519
IL-10 + PI3 + POSTN	0,85 (0,68 - 1,00)	101,4, 7.067, 6.519

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

La lista de combinaciones de biomarcadores fue más larga para el caso de la comparación de los pacientes con AA grave *vs.* grupo C (Tabla 22F). Hubo 5 combinaciones de 2 biomarcadores relevantes con resultados excelentes y muy buenos, 3 con IL-8 (con CHI3L1, PI3 o con POSTN) y 2 con SERPINB2 (POSTN o con PI3). La combinación de 3 con mejores resultados (test bueno), estuvo compuesta por IL-10, PI3 y POSTN.

Tabla 22F. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes AA grave del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
SERPINB2	0,77 (0,54 - 1,00)	0,086
CHI3L1+IL-8	1	20.202, 122
POSTN + SERPINB2	0,97 (0,87 - 1,00)	22.785, 0,086
IL-8 + PI3	0,95 (0,85 - 1,00)	122, 3.269
IL-8 + POSTN	0,95 (0,85 - 1,00)	3.269, 22.785
PI3 + SERPINB2	0,93 (0,78 - 1,00)	3.269, 0,086
IL-10 + POSTN	0,86 (0,68 - 1,00)	457,4, 22.785
CHI3L1 + PI3	0,80 (0,67 - 0,93)	20.202, 3.269
CHI3L1 + POSTN	0,80 (0,67 - 0,92)	20.202, 22.785
IL-10+PI3 + POSTN	0,89 (0,73 - 1,00)	457,4, 3.269, 22.785
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,81 (0,68 - 0,94)	20.202, 3.269, 22.785

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Por último, en la Tabla 22G se muestran los resultados más importantes del análisis por curvas ROC de la comparación de los pacientes con AR y el grupo C, destacando por su potencia estadística, las combinaciones de IL-8 con CHI3L1 o con POSTN.

Tabla 22G. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes AR del grupo C

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
IL-8	0,78 (0,48 – 1,00)	627
CHI3L1 + IL-8	1	9.953, 627
IL-8 + POSTN	0,90 (0,75 – 1,00)	627, 14.505
IL-8 + PI3	0,87 (0,68 – 1,00)	627, 7.232
PI3 + SERPINB2	0,83 (0,57 – 1,00)	7.232, 0,554
PI3 + POSTN	0,80 (0,65 – 0,94)	7.232, 14.505
POSTN + SERPINB2	0,80 (0,50 – 1,00)	14.505, 0,554
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,90 (0,69 – 1,00)	7.232, 14.505, 0,554
PI3 + POSTN + PHLDA1	0,82 (0,57 – 1,00)	7.232, 14.505, 0,014

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

4.2.1.4. *Ranking del análisis por curvas ROC de la expresión proteica: comparaciones entre los subgrupos de gravedad del asma*

Como en el apartado anterior (Apartado 4.2.2.3.), a continuación se destacan los biomarcadores más relevantes (IC95 % > 0,70) de los mejores marcadores individuales y combinados de dos en dos o de tres en tres, para discernir los subgrupos de gravedad de ANA y AA. Para discriminar la gravedad de la enfermedad ANA, se proponen los biomarcadores y sus combinaciones en la Tabla 22H. En las combinaciones de biomarcadores fue donde se encontraron valores de AUC buenos, muy buenos y excelentes y con una potencia estadística relevante. Clasificación buena tuvo la unión de POSTN con SERPINB2. En las 2 combinaciones de 3 biomarcadores que se encontraron más relevantes, POSTN estuvo presente: en una con IL-8 y CHI3L1 y en otra con PI3 y SERPINB2. Especial mención es la primera combinación de 3 citada aquí (POSTN + IL-8 + CHI3L1), ya que fue catalogado como un test excelente (AUC: 0,98) para discernir los pacientes con ANA moderada-leve de los pacientes graves.

Tabla 22H. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes ANA moderados-leves de ANA grave

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
IL-8	0,76 (0,49 – 1,00)	841
POSTN + SERPINB2	0,90 (0,71 – 1,00)	17.419, 0,132
IL-8 + PI3	0,82 (0,58 – 1,00)	841, 4.845
IL-8 + POSTN	0,78 (0,52 – 1,00)	841, 17.419
CHI3L1 + POSTN	0,77 (0,59 – 0,96)	18.500, 17.419
IL-10 + POSTN	0,77 (0,43 – 1,00)	105,2, 17.419
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,98 (0,92 – 1,00)	18.500, 841, 17.419
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,93 (0,78 – 1,00)	4.845, 17.419, 0,132
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,88 (0,69 – 1,00)	18.500, 841, 4.845
CHI3L1+POSTN+MSR1inf	0,80 (0,57 – 1,00)	18.500, 17.419, 0,056
CHI3L1 + POSTN + MSR1sup	0,80 (0,57 – 1,00)	18.500, 17.419, 0,257
CHI3L1 + PI3 + MSR1sup	0,78 (0,53 – 1,00)	18.500, 4.845, 0,257

Tabla 22I. Biomarcadores capaces de discriminar pacientes AA moderados-leves de AA grave

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
IL-8	0,82 (0,58 – 1,00)	17
SERPINB2	0,77 (0,44 – 1,00)	0,095
POSTN + SERPINB2	0,93 (0,78 – 1,00)	19.119, 0,095
CHI3L1 + SERPINB2	0,90 (0,69 – 1,00)	24.144, 0,095
PI3 + SERPINB2	0,87 (0,59 – 1,00)	5.524, 0,095
IL-8 + POSTN	0,84 (0,62 – 1,00)	17, 19.119

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica del grupo C, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. MSR1inf: expresión proteica de la banda inferior de MSR1. MSR1sup: expresión proteica de la banda superior de MSR1. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Las mejores opciones para discriminar los pacientes con AA moderada-leve de los pacientes graves (detalladas en la Tabla 22I) fueron biomarcadores individuales o combinaciones de 2. De los biomarcadores que se proponen, la combinación de POSTN con SERPINB2 fue la única con buena potencia estadística.

4.2.2. *Estudio de discriminación entre fenotipos clínicos*

Un aspecto muy importante, aparte de obtener marcadores de enfermedad (diferenciales del grupo control sano), es disponer de marcadores que puedan discernir distintos fenotipos clínicos (por ejemplo asma no alérgica de asma alérgica, asma no alérgica grave de asma alérgica grave, asma alérgica de alergia sin asma, etc...). Por ello, realizamos un estudio por curvas ROC, del potencial de las proteínas estudiadas (individualmente y de forma combinada), como biomarcadores capaces de discriminar óptimamente los distintos grupos y subgrupos (o fenotipos y subfenotipos) clínicos de nuestra población de estudio. Los resultados se resumen en las Tablas 23 y 24, siguiendo un esquema parecido al descrito en el Apartado de Resultados 4.2.1.

4.2.2.1. *Biomarcadores diferenciales entre el grupo con asma no alérgica y el grupo con asma alérgica*

A nivel individual, cuando se estudió la comparación del grupo de pacientes ANA frente al grupo de AA, CHI3L1, con un valor de AUC de 0,74, es el único que roza una clasificación buena. Todos los biomarcadores se clasificaron como regulares o malos ($AUC < 0,75$) (Tabla 23). Sin embargo, al estudiar la combinación de dos biomarcadores para esta discriminación, se observaron varias combinaciones con efectos sinérgicos importantes como: CHI3L1 + IL-8 (AUC individuales: 0,74 y 0,68, respectivamente; AUC combinado: 0,82; umbrales: 20.202 y 221 pg/ml, respectivamente), CHI3L1 + SERPINB2 (AUC combinado: 0,83; AUC y umbral de SERPINB2: 0,64 y 0,116 CR), IL-10 + POSTN (AUC individuales: 0,45 y 0,62, respectivamente; AUC combinado: 0,87; umbrales: 457,400 y 22.785 pg/ml, respectivamente), IL-8 + POSTN (AUC combinado: 0,76; AUC y umbral de IL8: 0,68 y 221 pg/ml), IL-8 + SERPINB2 AUC combinado: 0,82), y SERPINB2 + PHLDA1 (AUC combinado: 0,80; AUC y umbral de PHLDA1 0,40 y 0,012 CR). En todas estas combinaciones, los valores AUC corresponden a test buenos, mientras que los marcadores individuales son de categoría mediocre (Tabla 23A). Los análisis de combinaciones de tres biomarcadores también proporcionaron resultados muy buenos o buenos para esta discriminación que se destacan en negrita en la Tabla 24 y estas combinaciones mejoraban los valores AUC individuales en 15 de ellas (todas salvo las uniones de CHI3L1 + IL-10 + IL-8 y CHI3L1 + POSTN + PHLDA1).

El siguiente paso fue el análisis individual de los marcadores proteicos para discriminar los pacientes con ANA moderada-leve de los pacientes con AA moderada-leve, que como se observa en la Tabla 23B no proporcionó ningún resultado destacable. Todos los marcadores individuales

tuvieron un valor de $AUC < 0,75$, siendo IL-8 el único que se aproximó al límite de clasificación buena, con un valor AUC de 0,73. Sin embargo, 4 combinaciones de dos marcadores proteicos destacaron por sus buenos valores de AUC combinados (en negrita en la Tabla 23B). Respecto a las mejores combinaciones de tres biomarcadores, la Tabla 24 resalta para esta discriminación otras 4 en las que la POSTN estaba presente. Estas combinaciones de tres marcadores fueron test buenos para diferenciar el subgrupo moderado-leve entre el grupo ANA y el grupo AA.

Por último, en el análisis de marcadores diferenciales entre pacientes con ANA grave y los de diagnóstico AA grave, se encontraron dos proteínas, CHI3L1 (AUC: 0,82 y umbral: 20.202 pg/ml) y SERPINB2 (AUC: 0,78 y umbral: 0,110 CR) capaces de discernir de forma individual, como test buenos, estos dos subgrupos de pacientes. La Tabla 23C muestra todos los resultados de este análisis, con los biomarcadores individuales y combinados de dos en dos. Del análisis combinado de dos biomarcadores, destacan 3 combinaciones: IL-10 (AUC individual: 0,49) con POSTN (AUC individual: 0,69) (AUC combinado: 0,94; umbrales: 184,60 y 22.785 pg/ml, respectivamente); IL-8 (AUC individual: 0,63) con POSTN (AUC combinado: 0,86; umbrales: 122 y 22.785 pg/ml, respectivamente), y PI3 (AUC individual: 0,48) con SERPINB2 (AUC individual: 0,78) (AUC combinado: 0,92; umbrales: 5.758 pg/ml y 0,110 CR, respectivamente). La Tabla 24 resume el análisis total de las combinaciones de tres biomarcadores. De estos resultados, destacaron por su mejora relevante respecto a los valores AUC individuales, 3 combinaciones que dieron lugar a curvas de categoría muy buena y buena: CHI3L1 e IL-8 con POSTN (AUC individuales: 0,82, 0,63 y 0,69, respectivamente; AUC combinado: 0,96; umbrales: 20.202, 122 y 22.785 pg/ml, respectivamente), IL-10 y PI3 con POSTN (AUC individuales: 0,49, 0,48 y 0,69, respectivamente; AUC combinado: 0,94; umbrales: 184,60, 5.758 y 22.785 pg/ml, respectivamente), e IL-8 y PI3 con POSTN (AUC individuales: 0,63, 0,48 y 0,69, respectivamente; AUC combinado: 0,86; umbrales: 122, 5.758 y 22.785 pg/ml, respectivamente).

Tabla 23: Valores AUC del análisis de curvas ROC individual y combinando la expresión proteica de dos biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos ANA y AA

A. Grupo ANA comparado con el grupo AA

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,74	0,73	0,82	0,75	0,76	0,43	0,83
IL-10	-	0,45	0,71	0,46	0,87	ND	ND
IL-8	-	-	0,68	0,67	0,76	ND	0,82
PI3	-	-	-	0,57	0,67	0,60	0,69
POSTN	-	-	-	-	0,62	0,70	0,75
PHLDA1	-	ND	ND	-	-	0,40	0,80
SERPINB2	-	ND	-	-	-	-	0,64

B. Grupo ANA moderado-leve comparado con el grupo AA moderado-leve

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,66	0,60	0,80	0,63	0,72	ND	0,72
IL-10	-	0,60	ND	0,68	0,82	ND	ND
IL-8	-	ND	0,73	0,82	0,82	ND	ND
PI3	-	-	-	0,62	0,67	ND	0,68
POSTN	-	-	-	-	0,53	ND	0,40
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	-	ND	0,60

C. Grupo ANA grave comparado con el grupo AA grave

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,82	0,69	0,86	0,83	0,86	ND	ND
IL-10	-	0,49	ND	0,68	0,94	ND	ND
IL-8	-	ND	0,63	0,69	0,86	ND	ND
PI3	-	-	-	0,48	0,69	ND	0,92
POSTN	-	-	-	-	0,69	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
SERPINB2	ND	ND	ND	-	ND	ND	0,78

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. ND: no determinado debido a falta de datos. Las celdas con un guion indican comparaciones ya mostradas en otra celda de esta tabla.

Tabla 24: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos ANA y AA

Combinación de marcadores	Valor AUC ANA vs. AA	Valor AUC ANA ML vs. AA ML	Valor AUC ANA G vs. AA G
CHI3L1 + IL-10 + IL-8	0,76	ND	ND
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0,71	0,68	0,72
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,92	0,90	ND
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,82	0,71	0,88
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,88	ND	0,96
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,80	0,80	0,86
CHI3L1 + PI3 + PHLDA1	0,63	ND	ND
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0,84	0,72	ND
CHI3L1 + POSTN + PHLDA1	0,77	ND	ND
CHI3L1 + POSTN + SERPINB2	0,85	0,68	ND
CHI3L1 + PHLDA1 + SERPINB2	0,84	ND	ND
IL-10 + IL-8+PI3	0,82	ND	ND
IL-10 + IL-8+POSTN	0,87	ND	ND
IL-10 + PI3 + POSTN	0,87	0,82	0,94
IL-8 + PI3 + POSTN	0,76	0,84	0,86
IL-8 + PI3 + SERPINB2	0,80	ND	ND
IL-8 + POSTN+SERPINB2	0,82	ND	ND
PI3 + POSTN + PHLDA1	0,67	ND	ND
PI3 + POSTN + SERPINB2	0,77	0,64	ND
PI3 + PHLDA1+ SERPINB2	0,84	ND	ND

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. ND: combinaciones que no se pudieron hacer por falta de datos. ML: comparación de grupo de sujetos con ANA moderada-leve y AA moderada-leve. G: grupo de sujetos con ANA grave y AA grave.

4.2.2.2. *Biomarcadores diferenciales entre el grupo con asma alérgica y el grupo con alergia sin asma*

El análisis de la capacidad de los biomarcadores individuales y sus combinaciones para discernir los pacientes con AA de los pacientes con AR está detallado en la Tabla 25A. Como marcadores individuales, SERPINB2 (AUC: 0,93 y umbral: 0,116 CR) destacó como muy buen test, e IL-8 (AUC: 0,88 y umbral: 67 pg/ml) y POSTN (AUC: 0,80; umbral: 14.418 pg/ml) como buenos test para esta discriminación. Por otro lado, al combinar marcadores, se observó una mejora en los valores AUC en 3 combinaciones: CHI3L1 (AUC individual: 0,60 y umbral de 15.719 pg/ml) con IL-8 (AUC individual 0,88 y umbral 67 pg/ml) (AUC combinado: 0,91), o con SERPINB2, (AUC combinado: 1), y PI3 (AUC individual: 0,63 y umbral de 7.348 pg/ml) con PHLDA1 (AUC individual: 0,48 y umbral de 0,025 CR) (AUC: 0,76). Por otro lado, la Tabla 26 resume todos los resultados de las combinaciones de tres biomarcadores, destacando dos combinaciones con valores de AUC muy buenos: IL-8, PI3 y POSTN (AUC combinado: 0,93) e IL-8, PI3 y CHI3L1 (AUC: 0,91) para esta comparación.

También se realizó el análisis de curvas ROC comparando los subgrupos de gravedad de pacientes con AA frente a los pacientes con AR. Al comparar los pacientes con AA moderada-leve frente al grupo AR, 3 biomarcadores individualmente discriminaron con muy buena y buena sensibilidad y especificidad estos grupos: IL-8 (AUC: 0,96 y umbral de 67 pg/ml), POSTN (AUC: 0,83 y umbral de 14.418 pg/ml) y SERPINB2 (AUC: 0,84 y umbral de 0,116 CR) (Tabla 25B). Al combinar dos biomarcadores, se observó sinergia entre PI3 y SERPINB2 (AUC individuales: 0,60 y 0,84, respectivamente; AUC combinado: 0,92; umbrales: 7.256 pg/ml y 0,116 CR), que suponen una combinación muy buena para discernir estos pacientes (Tabla 25B). No hubo importantes mejoras respecto a los valores AUC individuales al analizar combinaciones de tres biomarcadores (Tabla 26).

Finalmente, SERPINB2 (AUC: 1 y umbral de 0,1 CR), IL-8 (AUC: 0,80 y umbral de 1.023 pg/ml) y POSTN (AUC: 0,77 y umbral de 14.732 pg/ml) fueron los biomarcadores individuales que mejor diferenciaban los sujetos con AA grave de los pacientes AR (Tabla 25C). La combinación de IL-8 y POSTN fue la única que mejoró un poco esta discriminación (AUC combinado: 0,90), pero si además se analiza junto con PI3 (AUC individual 0,66 y umbral 7.348 pg/ml), se obtiene un test excelente para esta discriminación, tal y como se resume en el estudio de combinación de 3 biomarcadores en la Tabla 26.

Tabla 25: Valores AUC del análisis de curvas ROC individual y combinando la expresión proteica de dos biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos AA y AR

A. Grupo asmático AA comparado con el grupo AR

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,60	ND	0,91	0,58	0,81	0,43	1
IL-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,88	0,89	0,90	ND	ND
PI3	-	ND	-	0,63	0,80	0,76	0,96
POSTN	-	ND	-	-	0,80	ND	ND
PHLDA1	-	ND	ND	-	ND	0,48	ND
SERPINB2	-	ND	ND	-	ND	ND	0,93

B. Grupo AA moderado-leve comparado con el grupo AR

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,60	ND	ND	0,57	0,82	ND	ND
IL-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,96	0,96	0,94	ND	ND
PI3	-	ND	-	0,60	0,80	ND	0,92
POSTN	-	ND	-	-	0,83	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	ND	ND	ND	-	ND	ND	0,84

C. Grupo AA grave comparado con el grupo AR

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	PHLDA1	SERPINB2
CHI3L1	0,60	ND	0,82	0,62	0,78	ND	ND
IL-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-8	-	ND	0,80	0,82	0,90	ND	ND
PI3	-	ND	-	0,66	0,80	ND	ND
POSTN	-	ND	-	-	0,77	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SERPINB2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. En gris fuerte se muestran los valores AUC individuales. ND: no determinado debido a falta de datos. Las celdas con un guion indican comparaciones ya mostradas en otra celda de esta tabla.

Tabla 26: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores. Comparación entre fenotipos clínicos AA y AR

Combinación de marcadores	Valor AUC AA vs. AR	Valor AUC AA ML vs. AR	Valor AUC AA G vs. AR
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,91	ND	0,82
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,80	0,81	0,80
CHI3L1 + PI3 + PHLDA1	0,71	ND	ND
IL-8 + PI3 + POSTN	0,93	0,96	0,98

Los valores AUC > 0,75, cuyas combinaciones de biomarcadores dan lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente se encuentran en negrita. ND: combinaciones que no se pudieron hacer por falta de datos. AA ML: grupo de sujetos con AA moderada-leve. AA G: grupo de sujetos con AA grave.

4.2.2.3. Ranking del análisis por curvas ROC de la expresión proteica: comparaciones entre fenotipos clínicos

En base a los análisis de curvas ROC individual y agrupados de los 9 biomarcadores proteicos estudiados (resumido en las anteriores tablas del Apartado 4.2.), las mejores opciones de biomarcadores para discriminar cada condición clínica analizada se detallan a continuación en la Tabla 27.

En la Tabla 27A, se proponen las combinaciones con clasificación buena y muy buena para discernir el grupo ANA del grupo AA. La mejor combinación de 2 biomarcadores fue IL-10 con POSTN. Hubo además 2 combinaciones relevantes de 3 biomarcadores, las dos con CHI3L1 y POSTN (más IL-10 o IL-8). En concreto, la combinación mencionada de CHI3L1 + POSTN + IL-10 se clasificó como muy buena para discriminar pacientes asmáticos con y sin alergia.

Tabla 27: Clasificación de los mejores biomarcadores proteicos individuales y combinados para cada comparación. Comparación entre los fenotipos clínicos

Tabla 27A. Grupo ANA comparado con el grupo AA

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
CHI3L1	0,74 (0,61 – 0,88)	20.202
IL-10 + POSTN	0,87 (0,74 – 1,00)	457,4, 22.785
CHI3L1 + SERPINB2	0,83 (0,64 – 1,00)	20.202, 0,116
CHI3L1 + IL-8	0,82 (0,64 – 0,99)	20.202, 221
IL-8 + SERPINB2	0,82 (0,58 – 1,00)	221, 0,116
PHLDA1 + SERPINB2	0,80 (0,50 – 1,00)	0,012, 0,116
IL-8 + POSTN	0,76 (0,57 – 0,94)	221, 22.785
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,92 (0,81 – 1,00)	20.202, 457,4, 22.785
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,88 (0,76 – 1,00)	20.202, 221, 22.785
PI3 + PHLDA1 + SERPINB2	0,84 (0,57 – 1,00)	5.126, 0,012, 0,166
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,80 (0,68 – 0,91)	20.202, 5.126, 22.785

Tabla 27B. Grupo ANA moderado-leve comparado con el grupo AA moderado-leve

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
IL-10+POSTN	0,82 (0,59 – 1,00)	167,9, 24.658
IL-8+POSTN	0,82 (0,58 – 1,00)	221, 24.658
IL-8+PI3	0,82 (0,53 – 1,00)	221, 5.028
CHI3L1+IL-8	0,80 (0,51 – 1,00)	20.227, 221
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0,90 (0,72 – 1,00)	20.227, 167,9, 24.658
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,80 (0,64 – 0,97)	20.227, 5.028, 24.658

Tabla 27C. Grupo ANA grave comparado con el grupo AA grave

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
CHI3L1	0,82 (0,67 – 0,98)	20.202
SERPINB2	0,78 (0,47 – 1,00)	0,11
IL-10+POSTN	0,94 (0,83 – 1,00)	184,6, 22.785
PI3+SERPINB2	0,92 (0,76 – 1,00)	5.758, 0,11
CHI3L1+POSTN	0,86 (0,72 – 1,00)	20.202, 22.785
IL-8+POSTN	0,86 (0,65 – 1,00)	122, 22.785
CHI3L1+IL-8	0,86 (0,64 – 1,00)	20.202, 122
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0,96 (0,86 – 1,00)	20.202, 122, 22.785

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica entre sí, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Para discernir entre pacientes con asma moderada-leve con y sin alergia, la propuesta más relevante es la unión de CHI3L1, IL-10 y POSTN (Tabla 27B). Por otro lado, para discriminar los pacientes con asma grave con y sin alergia hubo más opciones que se muestran en la Tabla 27C. Tres combinaciones destacaron por sus valores AUC muy buenos o buenos para discernir estos pacientes y por su potencia estadística relevante. Dos de ellas fueron combinaciones formadas por POSTN, junto con IL-10 o CHI3L1, y la otra fue PI3 con SERPINB2. El análisis conjunto de CHI3L1, PI3 y POSTN fue la única combinación de 3 biomarcadores considerada relevante, con un resultado muy bueno para discernir pacientes graves con ANA y AA.

Al realizar el estudio de la comparación del grupo AA frente al grupo AR, SERPINB2 e IL-8 fueron los biomarcadores individuales más destacados. A su vez, hubo 3 combinaciones de 2 marcadores que mostraron resultados excelentes y muy buenos para esta discriminación: en 2 participó CHI3L1, con SERPINB2 o con IL-8 y la otra combinación fue la de PI3 y SERPINB2. La combinación de IL-8 + PI3 + POSTN fue muy buena para discriminar estas dos enfermedades alérgicas (Tabla 27D).

Tabla 27D. Grupo AA comparado con el grupo AR

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
SERPINB2	0,93 (0,80 – 1,00)	0,116
IL-8	0,88 (0,72 – 1,00)	67
POSTN	0,80 (0,67 – 0,93)	14.418
CHI3L1+SERPINB2	1	15.719, 0,116
PI3+SERPINB2	0,96 (0,88 – 1,00)	7.348, 0,116
CHI3L1+IL-8	0,91 (0,78 – 1,00)	15.719, 67
CHI3L1+POSTN	0,81 (0,68 – 0,94)	15.719, 14.418
IL-8 + PI3 + POSTN	0,93 (0,82 – 1,00)	67, 7.348, 14.418

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica entre sí, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Para diferenciar los pacientes con AA moderada-leve de los pacientes con AR, (Tabla 27E) los mejores biomarcadores fueron: IL-8, las combinaciones de 2 biomarcadores de IL-8 con PI3, o con POSTN, y de PI3 con SERPINB2, y la combinación de 3 marcadores de IL-8 con PI3 y POSTN.

Tabla 27E. Grupo AA moderado-leve comparado con el grupo AR

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
IL-8	0,96 (0,86 – 1,00)	67
SERPINB2	0,84 (0,57 – 1,00)	0,116
POSTN	0,83 (0,67 – 1,00)	14.418
IL-8+PI3	0,96 (0,86 – 1,00)	67, 7.256
IL-8+POSTN	0,94 (0,82 – 1,00)	67, 14.418
PI3+SERPINB2	0,92 (0,74 – 1,00)	7.256, 0,116
PI3+POSTN	0,80 (0,63 – 0,98)	7.256, 14.418
IL-8 + PI3 + POSTN	0,96 (0,86 – 1,00)	67, 7.256, 14.418
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,81 (0,64 – 0,98)	16.093, 7.256, 14.418

Tabla 27F. Grupo AA grave comparado con el grupo AR

	Valor AUC (IC95%)	Umbral
SERPINB2	1	0,100
IL-8	0,80 (0,55 – 1,00)	1.023
POSTN	0,77 (0,58 – 0,95)	14.732
IL-8 + POSTN	0,90 (0,73 – 1,00)	1.023, 14.732
CHI3L1+IL-8	0,82 (0,58 – 1,00)	15.719, 1.023
IL-8 + PI3	0,82 (0,58 – 1,00)	1.023, 7.348
PI3 + POSTN	0,80 (0,62 – 0,97)	7.348, 14.732
CHI3L1 + POSTN	0,78 (0,61 – 0,96)	15.719, 14.732
IL-8 + PI3 + POSTN	0,98 (0,92 – 1,00)	1.023, 7.348, 14.732
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0,82 (0,58 – 1,00)	15.719, 1.023, 7.348
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0,80 (0,63 – 0,98)	15.719, 7.348, 14.732

Resumen de las mejores opciones para discriminar cada condición clínica entre sí, obtenidas del análisis por curvas ROC de la expresión proteica de los 9 biomarcadores, solos o combinados entre sí (con AUC > 0,75). En negrita se recalcan los biomarcadores con un intervalo de confianza del 95 % (IC95%) mayor que 0,70. AUC: área bajo la curva. El umbral se refiere a los niveles proteicos de cada biomarcador capaces de discernir cada condición clínica, indicando el valor AUC.

Finalmente, en la Tabla 27F se muestra la lista de los mejores biomarcadores para discriminar los pacientes con AA grave de los pacientes alérgicos. SERPINB2 fue el biomarcador individual más relevante. Del estudio conjunto de 2 biomarcadores, destacó la combinación de IL-8 con POSTN y del estudio de 3 biomarcadores tuvo resultado destacable el agrupamiento de IL-8, PI3 y POSTN.

5. ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Se realizaron varios tipos de análisis. Los primeros, resumidos en la Tabla 28, para definir, por un lado la correlación entre la expresión génica y proteica de cada uno de los biomarcadores de forma individual, y por otro, la correlación tanto de la expresión génica como proteica, entre los distintos biomarcadores. Un segundo tipo de análisis intentó determinar la correlación entre la expresión génica y proteica de estos biomarcadores con los parámetros clínicos y funcionales (Tabla 29), además de con los resultados de metilación.

5.1. Análisis de correlación entre la expresión génica y proteica

Los resultados de correlación entre la expresión génica y proteica de cada biomarcador, así como la correlación entre biomarcadores, agrupados por fenotipos clínicos se muestran en la Tabla 28. Aunque están indicados todos los resultados en los que hubo correlación significativa ($p < 0,05$), solo se consideraron relevantes, aquellas con un coeficiente de correlación de $r = 0,70$ o mayor. Según los criterios establecidos en el Apartado 12 de Materiales y Métodos, una correlación con una r mayor que 0,80 se considera fuerte y de 0,79 a 0,50 moderada.

Con este criterio, los pacientes con ANA (Tabla 28A), mostraron dos biomarcadores MSR1 y PHLDA1, con una importante correlación entre la expresión génica y proteica. Específicamente, la expresión génica de MSR1 en los pacientes ANA moderados-leves correlacionó con la expresión proteica de la banda inferior de MSR1 ($r = 0,728$, $p = 0,0262$). Por otro lado, en el grupo de pacientes ANA graves, se observó una fuerte correlación entre la expresión génica y proteica de PHLDA1 ($r = 0,998$, $p = 0,0400$).

El análisis de asociación de la expresión génica entre los distintos biomarcadores reveló fuertes correlaciones (con una r cercana a 0,80) y moderadas (con una $0,80 > r < 0,70$), entre la expresión génica de MSR1 y PHLDA1 en el grupo total de pacientes con ANA ($r = 0,794$, $p < 0,0001$), así como en los pacientes con asma grave ($r = 0,825$, $p = 0,0005$) y moderada-leve ($r = 0,789$, $p = 0,0039$). También, destacan las correlaciones en el grupo de pacientes con ANA grave entre la expresión génica de MSR1 con SERPINB2 ($r = 0,742$, $p = 0,0057$) o con IL-10 ($r = 0,724$, $p = 0,0051$), y de IL-1R2 con SERPINB2 ($r = 0,723$, $p = 0,0079$), con CHI3L1 ($r = 0,761$, $p = 0,0284$) o con IL-8 ($r = 0,727$, $p = 0,0049$); y en los pacientes con ANA moderada-leve, entre la expresión génica de MSR1 e IL-8 ($r = 0,727$, $p = 0,0112$). La expresión del gen PHLDA1 también se correlacionó fuertemente con IL-8 en todos los grupos de ANA, y especialmente en los sujetos con asma moderada-leve ($r = 0,821$, $p = 0,0006$). Por último, la expresión de IL-8 e IL-10 se asociaron estrechamente con SERPINB2 en todos los grupos, aunque la de IL-8 fue una de las

correlaciones más altas en los sujetos ANA graves ($r=0,807$, $p=0,0015$) y la de *IL-10* en el grupo de sujetos ANA moderados-leves ($r=0,802$, $p=0,0030$).

A nivel proteico, se encontraron dos asociaciones interesantes: primero, la alta correlación de la expresión proteica de la banda superior de MSR1 con la expresión de la proteína PHLDA1 en el grupo ANA ($r=0,999$, $p=0,0310$); y segundo, la correlación de IL-10 y CHI3L1 en los sujetos con ANA moderada-leve ($r=0,936$, $p=0,0019$).

El resto de correlaciones que se muestran en la Tabla 28A fueron también estadísticamente significativas pero con un r de valor moderado-bajo ($0,70 < r < 0,90$). Para PI3 y CPA3 no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa.

En el grupo de sujetos con AA (Tabla 28B), todas las correlaciones estadísticamente significativas estuvieron relacionadas con la expresión génica, destacando como las correlaciones más fuertes dos: la de *PI3* y *CPA3*, que se asociaron con un valor $r=0,974$ ($p=0,0010$) en los pacientes con AA grave, y la interacción entre las expresiones génicas de *SERPINB2* e *IL-8* en los pacientes con la condición clínica grave ($r=0,833$, $p=0,0001$), que también mostraron una correlación un poco menor en el grupo total de pacientes con AA ($r=0,751$, $p<0,0001$). Otras correlaciones destacables son las de *MSR1* y *SERPINB2* que como en el grupo de pacientes con ANA, estuvieron correlacionadas en el grupo de pacientes con AA grave ($r=0,725$, $p=0,0051$) y aquí también en el de sujetos AA moderados-leves ($r=0,720$, $p=0,0037$). *MSR1* también se asoció con la expresión génica de *PHLDA1* en pacientes AA graves ($r=0,749$, $p=0,0008$). Por último destacar la asociación de *IL-8* con *CHI3L1*, que es moderada-alta en pacientes con AA moderada-leve ($r=0,724$, $p=0,0424$), y la de *PI3* con *IL-1R2* ($r=0,740$, $p=0,0357$), en los pacientes con diagnóstico grave. Para *IL-10*, las asociaciones estadísticamente significativas encontradas fueron débiles, de valores r menores a 0,50.

En el grupo de pacientes con AR, la mayoría de las correlaciones que se encontraron estadísticamente significativas fueron de expresiones génicas entre los distintos biomarcadores. La más fuerte fue la de *CHI3L1* con *IL-1R2*, con un valor r de 0,829 ($p=0,0002$). Otra correlación destacable fue la de *IL-8* e *IL-1R2* ($r=0,704$, $p=0,0072$). En este grupo de pacientes, CPA3 no mostró correlaciones estadísticamente significativas (Tabla 28C).

Por otro lado, se encontró una fuerte correlación negativa y de gran interés entre la expresión proteica de *SERPINB2* y su expresión génica, con un coeficiente de correlación $r=-0,901$ ($p=0,0366$).

5.2. Análisis de correlación entre la expresión génica y el porcentaje de metilación

Ante los resultados obtenidos en el análisis de metilación, se decidió analizar si las diferencias de metilación observadas entre grupos, correlacionaban con la expresión génica y proteica de los distintos biomarcadores. Se obtuvieron dos correlaciones de alto grado en el grupo de ANA grave. La primera correlación fue la asociación positiva entre el grado de metilación de la isla CpG 4 de *MSR1* con su expresión génica ($r= 0,791$, $p= 0,0064$) y la segunda, la correlación negativa entre el porcentaje de metilación de la isla CpG 4 de *CHI3L1* con su expresión génica ($r= -0,846$, $p= 0,0163$).

Por otro lado, *PI3* también tuvo asociación en su expresión génica y proteica con el grado de metilación de su isla CpG3 en el grupo C. Las correlaciones fueron negativas y moderadas ($r= -0,645$, $p=0,0321$; $r= -0,710$, $p=0,0144$).

Tabla 28: Análisis de correlación de la expresión génica y proteica de los diferentes biomarcadores

A) Análisis de correlación de expresión génica y expresión proteica en los pacientes con ANA

		MSR1	SERPINB2	PHLDA1	IL-10	CHI3L1	IL-8	IL-1R2
MSR1	TOTAL		Expresión génica $r=0,671, p=0,0005$	Expresión génica $r=0,794, p<0,0001$	Expresión génica $r=0,534, p=0,0072$		Expresión génica $r=0,623, p=0,0011$	Expresión génica $r=0,517, p=0,0096$
				MSR1sup vs. expresión proteica $r=0,999, p=0,0310$				
	GRAVE		Expresión génica $r=0,742, p=0,0057$	Expresión génica $r=0,825, p=0,0005$	Expresión génica $r=0,724, p=0,0051$		Expresión génica $r=0,657, p=0,0147$	Expresión génica $r=0,602, p=0,0296$
	MOD-LEV	MSR1inf vs. Expresión génica $r=0,728, p=0,00262$	Expresión génica $r=0,646, p=0,0319$	Expresión génica $r=0,789, p=0,0039$			Expresión génica $r=0,727, p=0,0112$	
SERPINB2	TOTAL	-		Expresión génica $r=0,659, p=0,0005$	Expresión génica $r=0,678, p=0,0004$		Expresión génica $r=0,773, p<0,0001$	Expresión génica $r=0,555, p=0,0060$
	GRAVE	-		Expresión génica $r=0,674, p=0,0163$	Expresión génica $r=0,742, p=0,0057$		Expresión génica $r=0,807, p=0,0015$	Expresión génica $r=0,723, p=0,0079$
	MOD-LEV	-		Expresión génica $r=0,679, p=0,0152$	Expresión génica $r=0,802, p=0,0030$		Expresión génica $r=0,698, p=0,0116$	
PHLDA1	TOTAL	-	-		Expresión génica $r=0,608, p=0,0013$	Expresión génica $r=0,527, p=0,0203$	Expresión génica $r=0,708, p<0,0001$	
	GRAVE	-	-	Expresión proteica vs. Expresión génica $r=0,998, p=0,0400$			Expresión génica $r=0,734, p=0,0043$	
	MOD-LEV	-	-		Expresión génica $r=0,646, p=0,0231$		Expresión génica $r=0,821, p=0,0006$	
IL-10	TOTAL	-	-	-			Expresión génica $r=0,525, p=0,0071$	
	GRAVE	-	-				Expresión génica $r=0,569, p=0,0426$	Expresión génica $r=0,639, p=0,0192$
	MOD-LEV		-	-		Expresión proteica $r=0,936, p=0,0019$	Expresión génica $r=0,699, p=0,0114$	
CHI3L1	TOTAL							
	GRAVE			-	-			Expresión génica $r=0,761, p=0,0284$
	MOD-LEV							
IL-8	TOTAL	-	-	-	-			
	GRAVE	-	-	-	-			Expresión génica $r=0,727, p=0,0049$
	MOD-LEV	-	-	-	-			
IL-1R2		-	-		-	-	-	

B) Análisis de correlación de expresión génica y expresión proteica en los pacientes con AA

		MSR1	SERPINB2	PHLDA1	IL-10	CHI3L1	IL-8	PI3	CPA3	IL-1R2
MSR1	TOTAL		Expresión génica $r=0,690, p<0,0001$							
	GRAVE		Expresión génica $r=0,725, p=0,0051$	Expresión génica $r=0,749, p=0,0008$			Expresión génica $r=0,699, p=0,0078$			
	MOD-LEV		Expresión génica $r=0,720, p=0,0037$	Expresión génica $r=-0,573, p=0,0130$						
SERPINB2	TOTAL	-		Expresión génica $r=0,513, p=0,0044$		Expresión génica $r=0,527, p=0,0360$	Expresión génica $r=0,751, p<0,0001$			
	GRAVE	-		Expresión génica $r=0,603, p=0,0175$			Expresión génica $r=0,833, p=0,0001$			
	MOD-LEV	-								
PHLDA1	TOTAL		-				Expresión génica $r=0,579, p=0,0008$			
	GRAVE	-	-				Expresión génica $r=0,672, p=0,0061$			
	MOD-LEV	-								Expresión génica $r=0,635, p=0,0198$
IL-10	TOTAL									
	GRAVE									Expresión génica $r=0,619, p=0,0183$
	MOD-LEV									
CHI3L1	TOTAL		-	-			Expresión génica $r=0,655, p=0,0058$		Expresión génica $r=0,618, p=0,0321$	Expresión génica $r=0,560, p=0,0299$
	GRAVE			-						
	MOD-LEV						Expresión génica $r=0,724, p=0,0424$			
IL-8	TOTAL		-	-						Expresión génica $r=0,520, p=0,0054$
	GRAVE	-	-	-		-				Expresión génica $r=0,561, p=0,0368$
	MOD-LEV					-				
PI3	TOTAL								Expresión génica $r=0,611, p=0,0459$	
	GRAVE								Expresión génica $r=0,974, p=0,0010$	Expresión génica $r=0,740, p=0,0357$
	MOD-LEV									
CPA3		-	-	-		-	-	-	-	
IL-1R2				-	-	-	-	-		

C) Análisis de correlación de expresión génica y expresión proteica en los pacientes con AR

	MSR1	SERPINB2	PHLDA1	IL-10	CHI3L1	IL-8	PI3	IL-1R2
MSR1		Expresión génica $r=0,618, p=0,0322$						
SERPINB2	-	Expresión proteica vs. expresión génica $r=-0,901, p=0,0314$		Expresión génica $r=0,661, p=0,0376$			Expresión génica $r=0,571, p=0,0414$	
PHLDA1	-							
IL-10		-					Expresión génica $r=0,639, p=0,0344$	
CHI3L1								Expresión génica $r=0,829, p=0,0002$
IL-8							Expresión génica $r=0,699, p=0,0079$	Expresión génica $r=0,704, p=0,0072$
PI3		-		-		-		Expresión génica $r=0,578, p=0,0304$
IL-1R2					-	-	-	

Correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión génica y proteica de los diferentes biomarcadores con un valor $r > 0,50$. Celda gris oscura: correlación de expresión génica frente a proteica de un biomarcador. Celdas blancas: correlación de expresión génica entre distintos biomarcadores. Celda gris clara: correlación de expresión proteica entre distintos biomarcadores. En negrita se destacan las correlaciones con una $r > 0,70$ o $< -0,70$. A) Las correlaciones de PI3 y CPA3 no se representan en esta tabla porque no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas. B) Las correlaciones de IL-10 no se representan en esta tabla porque no se encontraron correlaciones con un $r > 0,50$. C) Las correlaciones de CPA3 no se representan en esta tabla porque no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas. TOTAL: grupo total de pacientes con ANA o AA. G: grupo de sujetos con ANA o AA grave. MOD-LEV: grupo de sujetos con ANA o AA moderada-leve. MSR1inf: banda inferior de MSR1. MSR1sup: banda superior de MSR1. La raya representa las correlaciones que por la distribución de la tabla ya se muestra en otra celda.

5.3. Análisis de correlación de la expresión génica y proteica con los parámetros clínicos y de funcionalidad pulmonar

Los parámetros clínicos (nivel total de IgE, porcentaje y número de eosinófilos) y parámetros de funcionalidad pulmonar (% FVC y % FVE₁) se analizaron con el objetivo de estudiar su correlación con la expresión génica y proteica de los marcadores estudiados. Se encontraron muchas correlaciones que se resumen en la Tabla 29. Destacar la correlación fuerte y positiva de la expresión proteica de la banda superior de MSR1 en los sujetos con ANA grave con % FVE₁ ($r = 0,780$, $p = 0,0223$). En el subgrupo con ANA moderada-leve, la expresión proteica de la banda superior de MSR1 también correlacionó fuertemente con % FVE₁ ($r = 0,887$, $p = 0,0033$).

Otras asociaciones fuertes e interesantes fueron las de SERPINB2. En el grupo con ANA moderada-leve, la expresión génica de *SERPINB2* correlacionó de forma moderada y negativa con % FVE₁ ($r = -0,724$, $p = 0,0179$) y estrecha y positivamente con el porcentaje de eosinófilos ($r = 0,998$, $p = 0,0382$) y el número de eosinófilos ($r = 0,999$, $p = 0,0081$).

Para el caso de la expresión génica de *IL-10* se observó una correlación negativa moderada-fuerte en el grupo de sujetos ANA en el grupo de pacientes con diagnóstico moderado-leve que se relaciona con % FVE₁ ($r = -0,752$, $p = 0,0121$).

Cuando se estudiaron las asociaciones de CHI3L1, se obtuvieron resultados relevantes en el subgrupo de pacientes ANA moderados-leves, relacionando su expresión proteica con % FVE₁ ($r = 0,746$, $p = 0,0034$). En el grupo de pacientes con AR solo se estudió la correlación de la concentración total de IgE con la expresión proteica y génica, y no se encontraron correlaciones estadísticamente relevantes.

El porcentaje de eosinófilos tuvo una fuerte correlación en el grupo ANA moderado-leve con la expresión génica de *IL-8* ($r = 0,997$, $p = 0,0462$) así como con la expresión proteica de IL-8 en los pacientes graves del grupo AA ($r = 0,997$, $p = 0,0161$).

La expresión génica de PI3 fue importante para el grupo AA grave. Se relacionó negativamente con % FVC ($r = -0,748$, $p = 0,0330$) y % FVE ($r = -0,783$, $p = 0,0216$) en este grupo de pacientes, con una correlación moderada y moderada-alta, respectivamente.

Los biomarcadores PHLDA1 y CPA3 solo mostraron correlaciones moderadas bajas ($r < 0,70$) e IL-1R2 no mostró correlaciones estadísticamente significativas con de los parámetros analizados.

Tabla 29: Análisis de correlación entre la expresión génica, proteica y parámetros clínicos

		Grupo Total	Grupo G	Grupo ML
MSR1	%FVE ₁	Expresión proteica Banda superior, ANA $r=0,679, p=0,0038$	Expresión proteica Banda superior, ANA $r=0,780, p=0,0223$	Expresión génica, ANA $r=-0,682, p=0,0432$
				Expresión proteica Banda superior, ANA $r=0,887, p=0,0033$
SERPINB2	%FVE ₁			Expresión génica, ANA $r=-0,724, p=0,0179$
	%FVC	Expresión proteica, ANA $r=-0,646, p=0,0437$		
	Número de eosinófilos			Expresión génica, ANA $r=0,999, p=0,0081$
	%Eosinófilos			Expresión génica, ANA $r=0,998, p=0,0382$
PHLDA1	%FVE ₁			Expresión génica, ANA $r=-0,674, p=0,0229$
IL-10	%FVE ₁			Expresión génica, ANA $r=-0,752, p=0,0121$
	IgE Total	Expresión proteica, ANA $r=0,654, p=0,0290$		
CHI3L1	%FVC		Expresión proteica, ANA $r=-0,620, p=0,0136$	Expresión proteica, ANA $r=0,673, p=0,0118$
	%FVE ₁			Expresión proteica, ANA $r=0,746, p=0,0034$
IL-8	Número de eosinófilos	Expresión proteica, AA $r=0,685, p=0,0410$		
	%Eosinófilos		Expresión proteica, AA $r=0,847, p=0,0161$	Expresión génica, ANA $r=0,997, p=0,0462$
PI3	%FVC		Expresión génica, AA $r=-0,748, p=0,0330$	
	%FVE ₁		Expresión génica, AA $r=-0,783, p=0,0216$	
CPA3	IgE Total		Expresión génica, ANA $r=0,691, p=0,0270$	
	%Eosinófilos		Expresión génica, AA $r=0,681, p=0,0434$	

Se muestran las correlaciones estadísticamente significativas con un valor $r > 0,50$. En negrita se muestran las correlaciones con un valor $r > 0,70$ o $< -0,70$. Las correlaciones de IL-1R2 no se representan en esta tabla porque no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas. Total: pacientes del grupo C o con ANA, AA o AR. G: pacientes con asma grave, no alérgica o alérgica. ML: pacientes con asma moderada-leve, no alérgica o alérgica. %FVE₁: porcentaje del volumen vital forzado en un segundo. %FVC: porcentaje predictivo de la capacidad vital forzada. Celdas blancas: correlación de expresión génica. Celda gris clara: correlación de expresión proteica.

6. ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA DE MSR1

Para este estudio se recibieron nuevas muestras de sangre fresca de pacientes que formaron la población 2 o P2. El análisis se realizó en paralelo en la sangre completa y en PBMC aisladas de cada paciente, según el protocolo descrito en el Apartado 13 de Materiales y Métodos.

Como ya se ha mencionado, se decidió analizar la presencia de MSR1 a nivel periférico, por ser un marcador muy relevante en nuestros resultados, importante también en la gravedad de otras enfermedades respiratorias como EPOC y usualmente asociado a localizaciones tisulares. Por ello, intentamos caracterizar su procedencia, mediante el análisis de distintas poblaciones celulares en sangre completa y en PBMC de sujetos control y pacientes con distintas patologías respiratorias: asma no alérgica, asma alérgica y EPOC y además, estudiar las diferencias que pudiese haber atendiendo a la gravedad de asma y EPOC.

Aunque no es uno de los objetivos de esta Tesis y la población de estudio es pequeña para sacar conclusiones definitivas, se analizaron las diferencias por grupo clínico de estudio, en los porcentajes de las subpoblaciones celulares estudiadas. Las dos siguientes tablas (Tabla 30 y 31) muestran los porcentajes medios de cada subpoblación celular analizada (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B y monocitos) por fenotipo clínico, independientemente de la expresión de MSR1. La Tabla 30 muestra los resultados obtenidos en sangre. Los linfocitos T CD4⁺ fueron estadísticamente relevantes en el grupo con EPOC. Su porcentaje fue menor en el grupo con EPOC grave al compararlo con el grupo C ($p=0,0215$) y con el grupo con EPOC moderada-leve ($p=0,0072$). Además, los pacientes con EPOC moderada-leve tuvieron un porcentaje de células CD4⁺ mayor que el grupo con ANA moderada-leve ($p=0,0370$).

En los linfocitos CD8⁺, las diferencias con significación estadística en su porcentaje se observaron en el análisis por gravedad del asma y EPOC. Los pacientes con AA grave tuvieron un porcentaje menor que el grupo C ($p=0,0286$) y los pacientes AA con diagnóstico moderado-leve ($p=0,0150$). A su vez, el grupo con AA moderada-leve tuvo un porcentaje mayor que el grupo con ANA moderada-leve ($p=0,0087$). Los pacientes con ANA moderada-leve mostraron un porcentaje estadísticamente menor que los sujetos con EPOC moderada-leve ($p=0,0433$).

De nuevo, en los linfocitos B (células CD19⁺) el grupo con EPOC tuvo diferencias significativas al compararlo con el grupo C ($p=0,0487$) y los pacientes con diagnóstico grave también ($p=0,0154$).

Por último, los monocitos (células CD14+) tuvieron un porcentaje mayor en el grupo con EPOC moderada-leve al compararlo con el grupo C ($p= 0,0239$) y el grupo con ANA moderada leve ($p= 0,0145$).

Tabla 30: Valores medios de las subpoblaciones celulares estudiadas en sangre completa

	Gravedad de enfermedad	% células CD4 ⁺	% células CD8 ⁺	% células CD19 ⁺	% células CD14 ⁺
Grupo C (n=11)		16,86 ± 4,08*	7,76 ± 2,63#	2,55 ± 0,56	4,58 ± 1,29*
Grupo ANA (n=11)		14,97 ± 5,32	7,24 ± 3,52	2,03 ± 1,32	4,20 ± 2,06
	ANA ML (n=6)	13,28 ± 5,01#	5,70 ± 1,20*	2,25 ± 1,39	3,40 ± 1,88*
	ANA G (n=5)	16,65 ± 5,50	8,87 ± 4,48	1,82 ± 1,34	5,00 ± 2,07
Grupo AA (n=13)		14,02 ± 5,17	6,35 ± 2,90	3,10 ± 1,99	4,63 ± 2,28
	AA ML (n=6)	16,33 ± 1,66	8,32 ± 1,57#	2,90 ± 0,94	5,50 ± 2,55
	AA G (n=7)	12,04 ± 6,43	4,66 ± 2,74	3,27 ± 2,66	3,89 ± 1,89
Grupo EPOC (n=11)		15,25 ± 5,83	6,56 ± 3,12	1,79 ± 1,05*	5,87 ± 2,09
	EPOC ML (n=5)	19,62 ± 2,87**	7,22 ± 0,79**	1,98 ± 1,22	6,26 ± 0,94
	EPOC G (n=6)	11,62 ± 4,55	6,02 ± 3,88	1,63 ± 0,74*	5,55 ± 2,51

ML: diagnóstico moderado-leve, G: diagnóstico grave. Columna % CD4⁺: *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con EPOC grave. **Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre el grupo indicado y el grupo con EPOC grave. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con EPOC moderada-leve. Columna % CD8⁺: *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre el grupo indicado y el grupo con AA moderada-leve. **Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con ANA moderada-leve. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con AA grave. Columna % CD19⁺: *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo C. Columna % CD14⁺: *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con EPOC moderada-leve.

En el estudio de subpoblaciones celulares realizado en PBMC, las diferencias estadísticamente significativas se observaron en las células CD4⁺ y CD14⁺ (Tabla 31), en el análisis por gravedad de enfermedad. Los pacientes con EPOC moderada-leve presentaron un porcentaje mayor de linfocitos T CD4⁺ al compararlos con los pacientes con EPOC grave ($p= 0,0435$), con ANA moderada-leve ($p= 0,0183$) y con AA moderada-leve ($p= 0,0023$). Por otro lado, el porcentaje de células CD14⁺ fue estadísticamente mayor en el grupo con AA moderada-leve que el grupo ANA moderado-leve ($p= 0,0378$).

Tabla 31: Valores medios de las subpoblaciones celulares estudiadas en PBMC

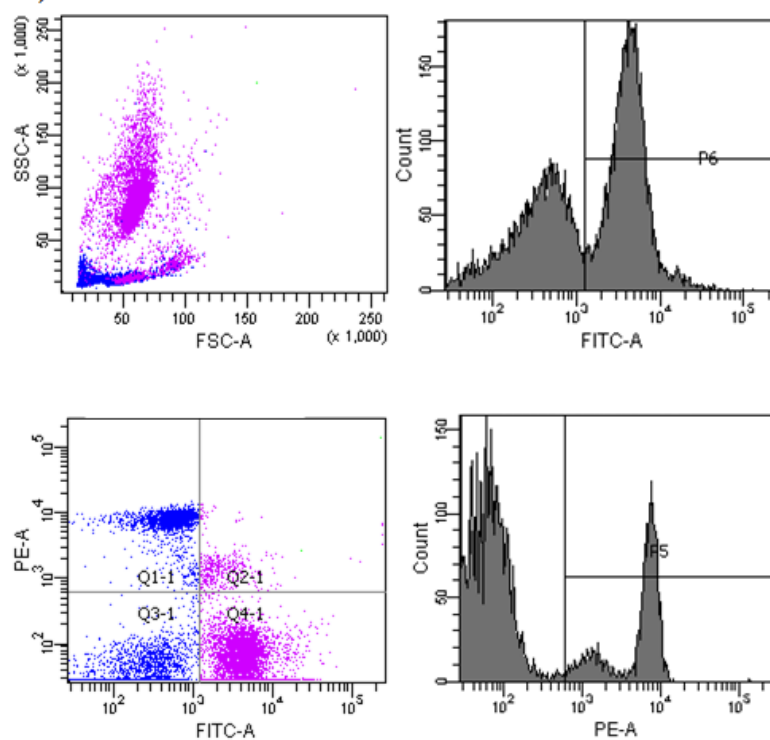
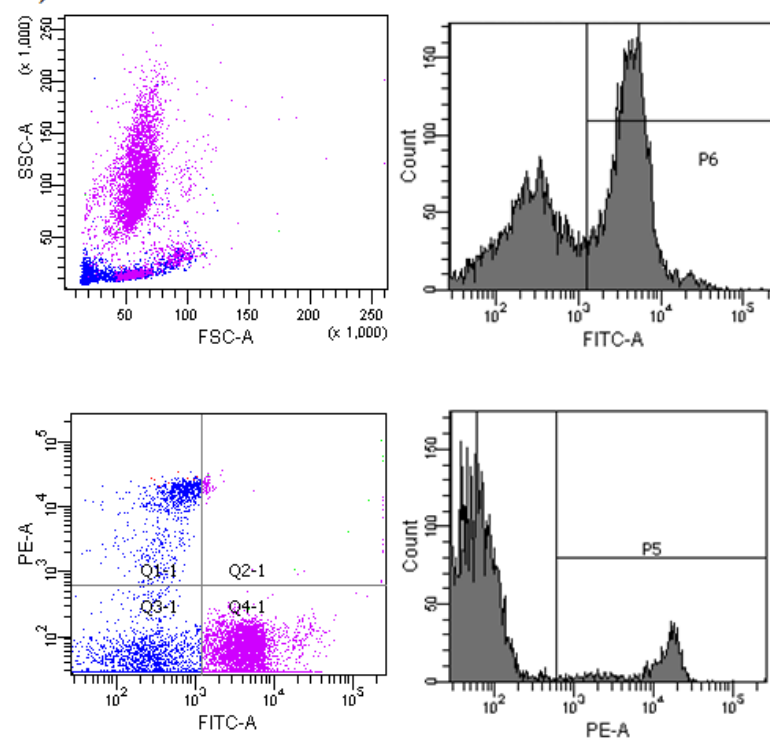
	Gravedad de enfermedad	% CD4 ⁺	% CD8 ⁺	% CD19 ⁺	% CD14 ⁺
Grupo C (n=11)		45,94 ± 14,67	20,48 ± 4,26	4,45 ± 1,85	8,12 ± 5,84
Grupo ANA (n=11)		43,80 ± 12,22	21,59 ± 7,38	5,59 ± 4,24	9,21 ± 4,16
	ANA ML (n=6)	38,50 ± 12,25*	19,58 ± 7,59	5,03 ± 2,58	7,90 ± 2,47*
	ANA G (n=5)	50,16 ± 9,64	24,00 ± 7,12	6,26 ± 5,98	10,78 ± 5,47
Grupo AA (n=13)		43,91 ± 6,99	18,82 ± 6,24	5,17 ± 3,28	12,02 ± 4,24
	AA ML (n=6)	40,92 ± 5,59**	21,42 ± 5,87	4,27 ± 2,93	10,65 ± 1,35
	AA G (n=7)	45,61 ± 8,02	16,59 ± 6,04	5,94 ± 3,59	13,20 ± 5,56
Grupo EPOC (n=11)		46,84 ± 13,31	19,08 ± 6,40	4,31 ± 2,98	12,21 ± 6,27
	EPOC ML (n=5)	55,40 ± 4,95	20,18 ± 2,53	4,96 ± 4,28	10,56 ± 2,02
	EPOC G (n=6)	39,70 ± 14,15*	18,17 ± 8,63	3,77 ± 1,54	13,58 ± 8,39

ML: diagnóstico moderado-leve, G: diagnóstico grave. Columna % CD4⁺: *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con EPOC moderada-leve.**Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre el grupo indicado y el grupo con EPOC moderada-leve. Columna % CD14⁺: *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo con AA moderada-leve.

6.1. Análisis de MSR1 por citometría de flujo

Para este estudio se analizaron los niveles de MSR1 por citometría de flujo porque esta técnica permite determinar los porcentajes de esta proteína en las distintas subpoblaciones de PBMC. En este caso, se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B (con el marcador característico CD19⁺) y monocitos (marcador CD14⁺).

Dos ejemplos de la visualización de estas subpoblaciones de células en sangre y en PBMC, a través de los histogramas obtenidos mediante esta técnica, se muestran en las Figuras 15 y 16, respectivamente.

A) MSR1⁺CD4⁺**B) MSR1⁺CD8⁺**

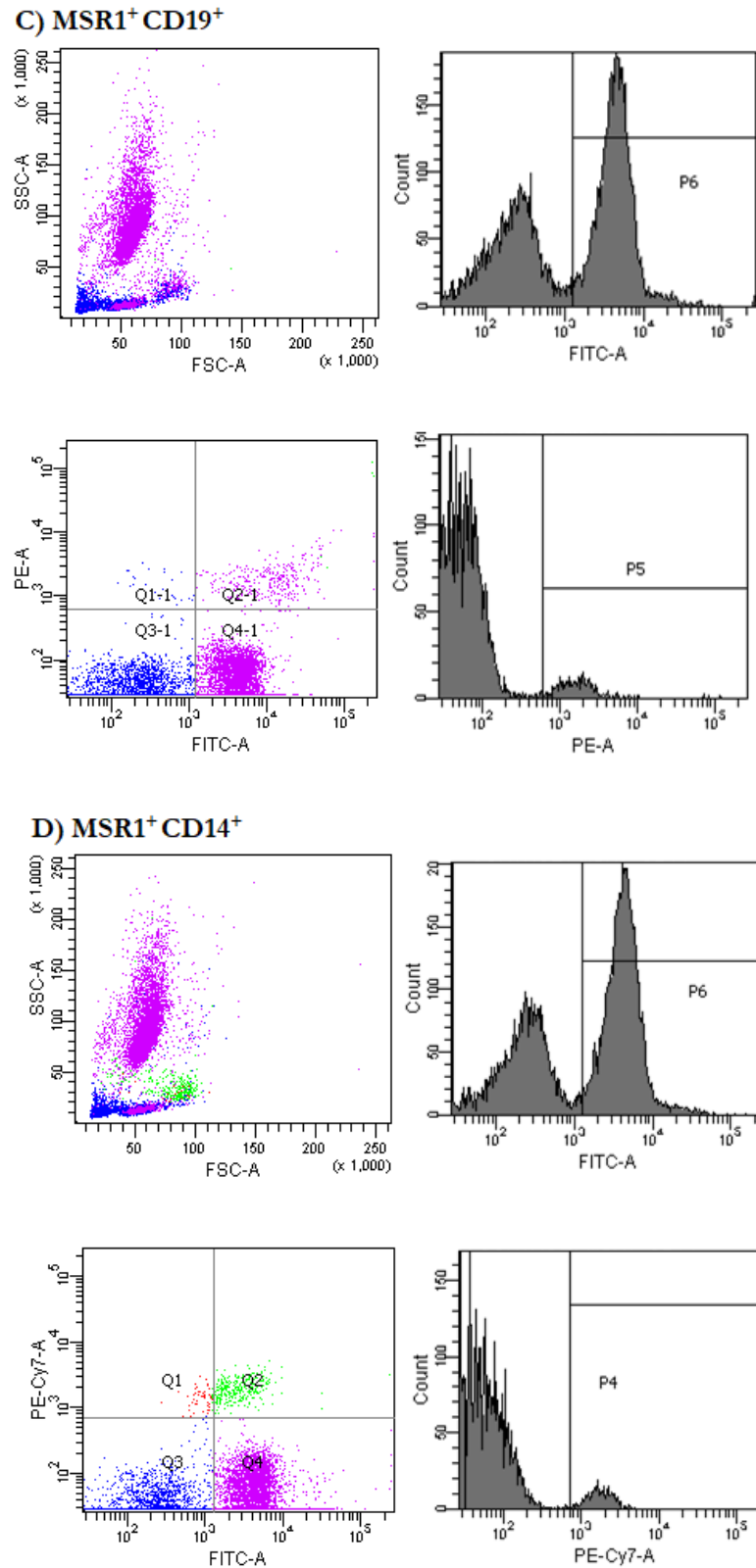
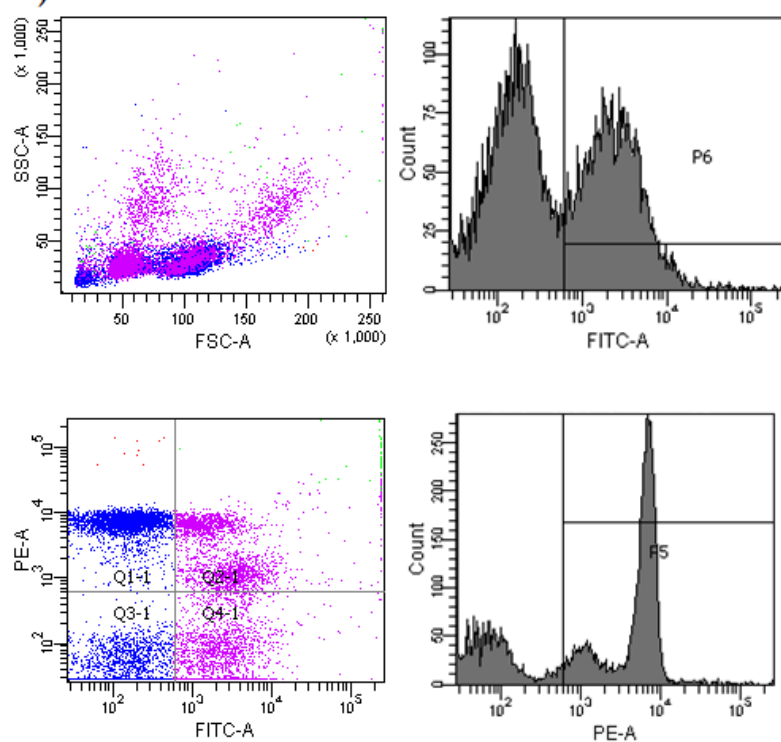
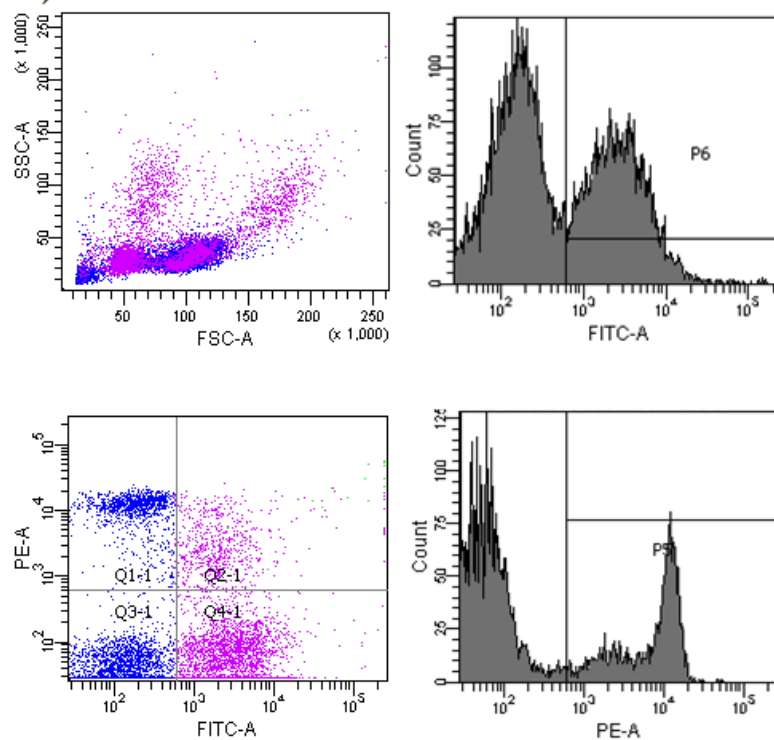


Figura 15: Ejemplo de histogramas obtenidos por citometría de flujo de las subpoblaciones en sangre. A) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD4 (en PE). B) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD8 (en PE). C) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD19 (en PE). D) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD14 (en PC7). FSC: *forward-scattered light*. SSC: *side-scattered light*.

A) MSR1⁺CD4⁺**B) MSR1⁺CD8⁺**

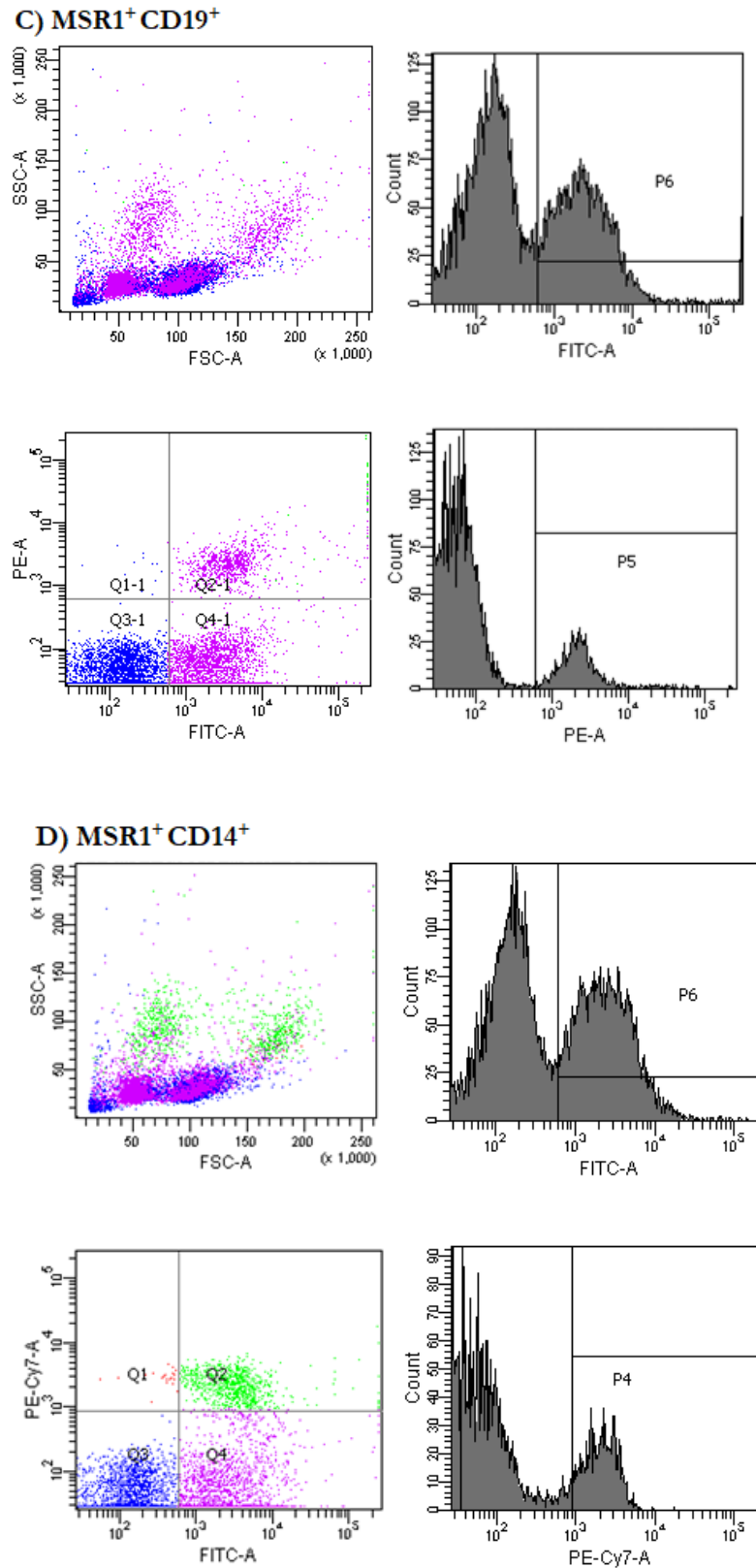


Figura 16: Ejemplo de histogramas obtenidos por citometría de flujo de las subpoblaciones en PBMC. A) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD4 (en PE). B) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD8 (en PE). C) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD19 (en PE). D) Histogramas del marcaje de MSR1 (en FITC) y CD14 (en PC7). FSC: *forward-scattered light*. SSC: *side-scattered light*.

6.1.1. Análisis de expresión proteica de MSR1: resultados totales

Se estudió por citometría de flujo, en sangre total y en PBMC purificadas, los niveles medios totales de expresión de MSR1 en los 4 grupos de sujetos (C, ANA, AA y EPOC) y en los subgrupos de pacientes en función de la gravedad. Además, se examinaron los niveles de esta proteína en las 4 subpoblaciones celulares estudiadas (linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B y monocitos), y el porcentaje de MSR1 presente en otras poblaciones no caracterizadas en este análisis.

Como se resume en la Figura 17, en el análisis de sangre no se observaron diferencias significativas en la media del porcentaje de expresión de MSR1 total, ni en sangre completa, ni analizando las 4 subpoblaciones, en ninguna de las comparaciones realizadas (entre los 4 grupos de estudio o entre los subgrupos clínicos en función de la gravedad). Sin embargo, sí se observó una tendencia en el grupo de pacientes con EPOC de presentar un porcentaje medio de MSR1⁺ total, mayor que el resto de los grupos clínicos. Al distinguir la gravedad de las enfermedades, hubo mayor porcentaje de células con su expresión en pacientes con ANA grave al compararlo con los de diagnóstico moderado-leve (sin diferencias estadísticamente significativas) y además, los pacientes con EPOC grave tendían a presentar un porcentaje mayor de MSR1⁺ en el total de las subpoblaciones celulares estudiadas al compararlo con el resto de grupos.

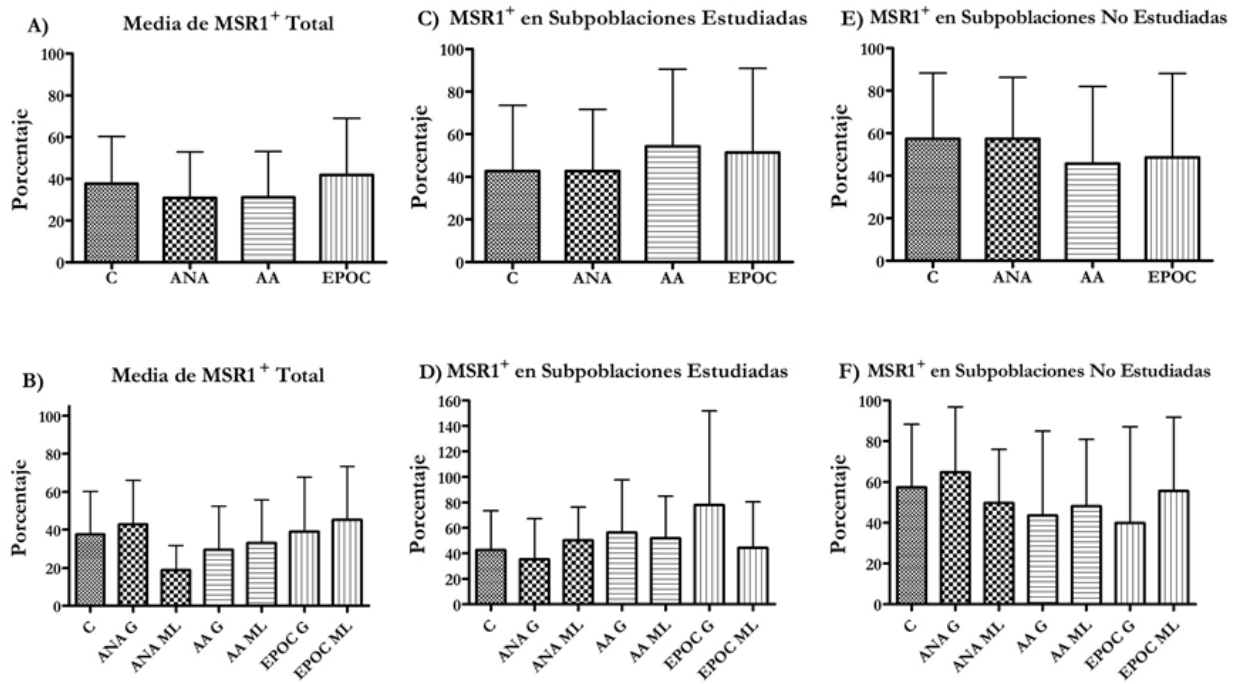


Figura 17: Porcentajes totales de expresión proteica de MSR1⁺ en sangre completa. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve. A) Porcentaje de la media de MSR1⁺total por fenotipos clínicos. B) Porcentaje de la media de MSR1⁺total por gravedad de enfermedades. C) Porcentaje de MSR1⁺en las subpoblaciones celulares estudiadas por fenotipos clínicos. D) Porcentaje de MSR1⁺en las subpoblaciones celulares estudiadas por gravedad de enfermedades. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar del grupo con EPOC grave. E) Porcentaje de MSR1⁺en las subpoblaciones celulares no estudiadas por fenotipos clínicos. F) Porcentaje de MSR1⁺en las subpoblaciones celulares no estudiadas por gravedad de enfermedades. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve.

Por otro lado, en el análisis de las PBMC purificadas sí que se encontraron diferencias significativas, como se representa en la Figura 18. La media del porcentaje de MSR1 positivo total fue mayor en el grupo con EPOC comparado con el resto de grupos (grupo EPOC: $48,97 \pm 12,31$ % *vs.* grupo C: $34,36 \pm 9,30$ % y $p = 0,0051$, grupo ANA: $38,05 \pm 9,22$ % y $p = 0,0288$, grupo AA: $33,81 \pm 9,42$ % y $p = 0,0025$) (Figura 18A). Al analizar estos resultados según la gravedad de la enfermedad asmática y la EPOC, el ANA grave ($44,98 \pm 7,14$ %) tuvo unos niveles de MSR1 total superiores a los del grupo C ($34,36 \pm 9,30$ %, $p = 0,0408$) y a los del ANA moderado-leve ($32,27 \pm 6,42$ %, $p = 0,0125$). Esta expresión también fue significativamente mayor en los grupos con EPOC grave ($48,37 \pm 9,27$ %, $p = 0,0095$) y con EPOC moderada-leve ($49,70 \pm 16,44$ %, $p = 0,0302$) respecto del grupo C (Figura 18B). Entre los distintos fenotipos y su gravedad también se encontraron diferencias significativas, así fue para el caso del grupo con EPOC con diagnóstico moderado-leve al compararlo con el grupo de pacientes con ANA moderada-leve ($p = 0,0394$) y con AA moderada-leve ($29,62 \pm 9,57$ %, $p = 0,0319$); y en la comparación del grupo con EPOC grave y AA grave ($37,40 \pm 8,27$ %, $p = 0,0454$).

Al analizar el porcentaje de MSR1⁺ en las subpoblaciones de células estudiadas, hubo diferencias significativas entre el grupo ANA y el AA ($87,36 \pm 16,32 \%$ y $98,43 \pm 3,96 \%$, $p= 0,0268$, respectivamente) (Figura 18C y E). A nivel de gravedad, no se encontraron diferencias significativas en las poblaciones celulares estudiadas como se muestra en las Figuras 18D, aunque se observa que tanto en EPOC grave como en ANA (grave y moderada-leve) hay un pequeño porcentaje de expresión de MSR1 que no corresponde a las poblaciones celulares analizadas en este estudio (Figura 18F).

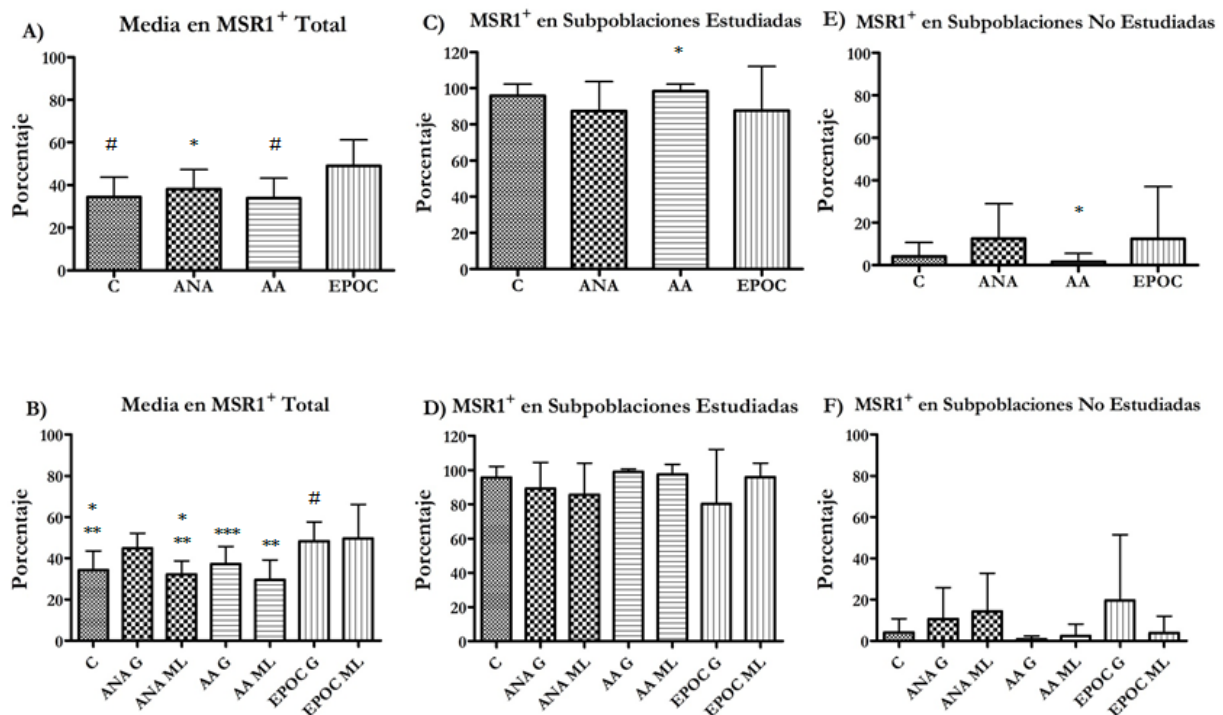


Figura 18: Porcentajes totales de expresión proteica de MSR1⁺ en PBMC. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve. A) Porcentaje de la media de MSR1⁺total por fenotipos clínicos. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo EPOC. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre el grupo indicado y el grupo EPOC. B) Porcentaje de la media de MSR1⁺total por gravedad de enfermedades. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo ANA G. **Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo EPOC ML. ***Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo EPOC G. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre el grupo indicado y el grupo C. C) Porcentaje de MSR1⁺ en las subpoblaciones celulares estudiadas por fenotipos clínicos. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo ANA. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar del grupo con EPOC. D) Porcentaje de MSR1⁺ en las subpoblaciones celulares estudiadas por gravedad de enfermedades. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar de algunos de los grupos. E) Porcentaje de MSR1⁺ en las subpoblaciones celulares no estudiadas por fenotipos clínicos. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo ANA. F) Porcentaje de MSR1⁺ en las subpoblaciones celulares no estudiadas por gravedad de enfermedades.

6.1.2. *Análisis de expresión proteica de MSR1: resultados de subpoblaciones celulares estudiadas*

Otro análisis que se realizó fue el de comparar por grupos clínicos y subgrupos de gravedad, la expresión de MSR1 en las 4 cuatro subpoblaciones celulares estudiadas, es decir, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B (marcador CD19⁺) y monocitos (marcador CD14⁺), tanto en sangre completa (Figuras 19A y B) como en PBMC purificadas (Figuras 20A y B).

Los resultados en sangre completa, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MSR1 entre los grupos clínicos, en ninguna población de las analizadas (Figura 19A). Sin embargo, en general en todos los grupos de la población P2 se ve que MSR1 se expresa, en mayor medida en los linfocitos B (marcados con el marcador CD19) y los monocitos (marcados con CD14) y en menor medida en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Además, se observó una tendencia de mayor expresión de MSR1 en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el grupo con AA y menor en la subpoblación CD14⁺(monocitos) en el grupo ANA comparado con el resto de grupos (Figura 19A). Sin embargo, cuando realizamos el análisis por gravedad, sí que hubo diferencias estadísticamente significativas que se muestran en la Figura 19B. Los pacientes con ANA moderada-leve ($73,60 \pm 11,75$ %) tuvieron porcentajes menores de células MSR1⁺CD19⁺ que los sujetos C ($91,95 \pm 5,31$ %, $p= 0,0004$), que los pacientes con ANA grave ($95,54 \pm 6,09$ %, $p= 0,0023$) y que los pacientes con EPOC moderada-leve ($97,51 \pm 3,45$ %, $p= 0,0018$). Además el grupo AA moderado-leve ($75,60 \pm 13,30$ %) tuvo valores de MSR1 y CD19 positivos menores que los sujetos sanos ($p= 0,0024$), que los pacientes con diagnóstico AA grave ($91,20 \pm 5,83$ %, $p= 0,0165$) y que los pacientes con EPOC moderada-leve ($p= 0,0062$).

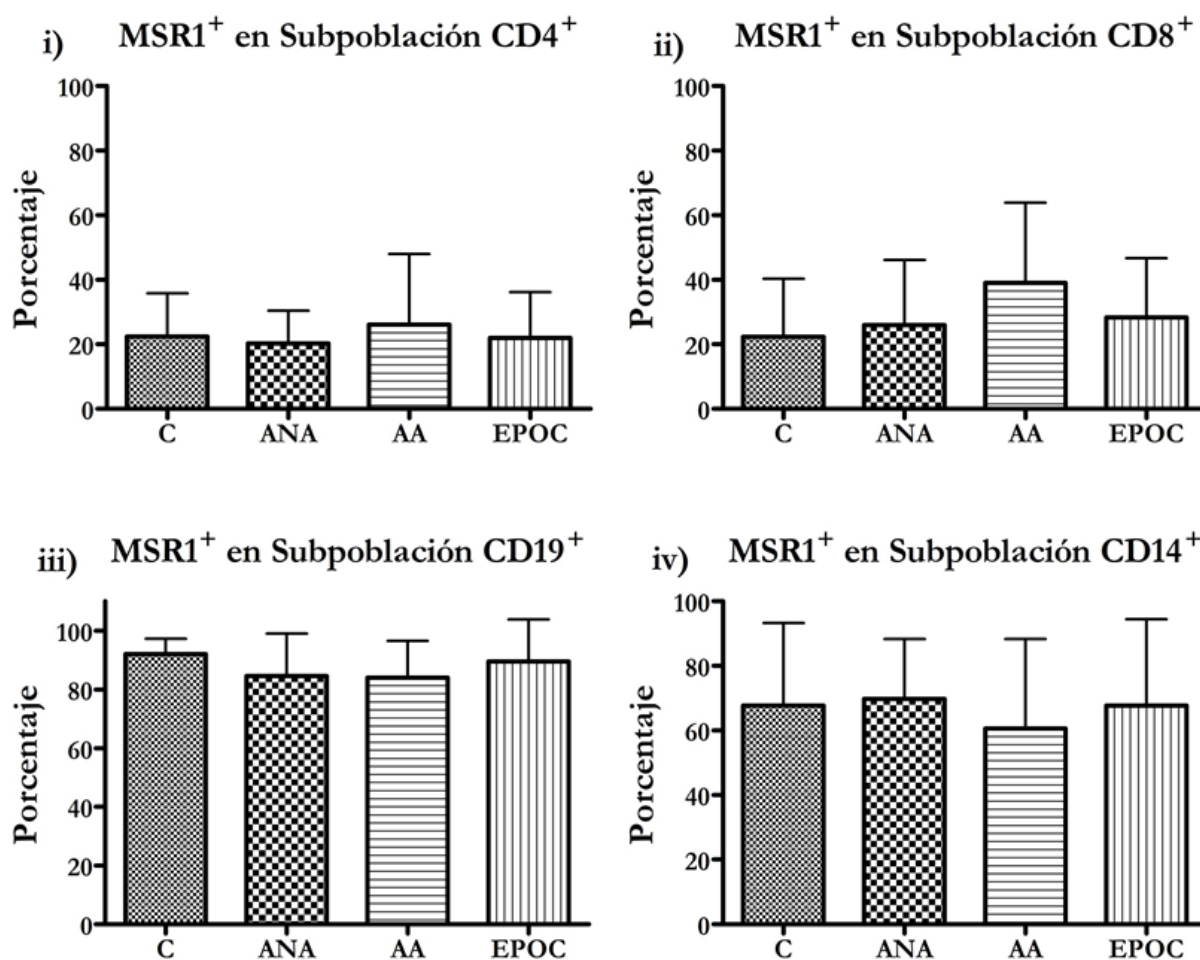


Figura 19A: Expresión de MSR1⁺ en subpoblaciones celulares analizadas en sangre completa y por fenotipos clínicos. i) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD4⁺. ii) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD8⁺. iii) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD19⁺. iv) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD14⁺.

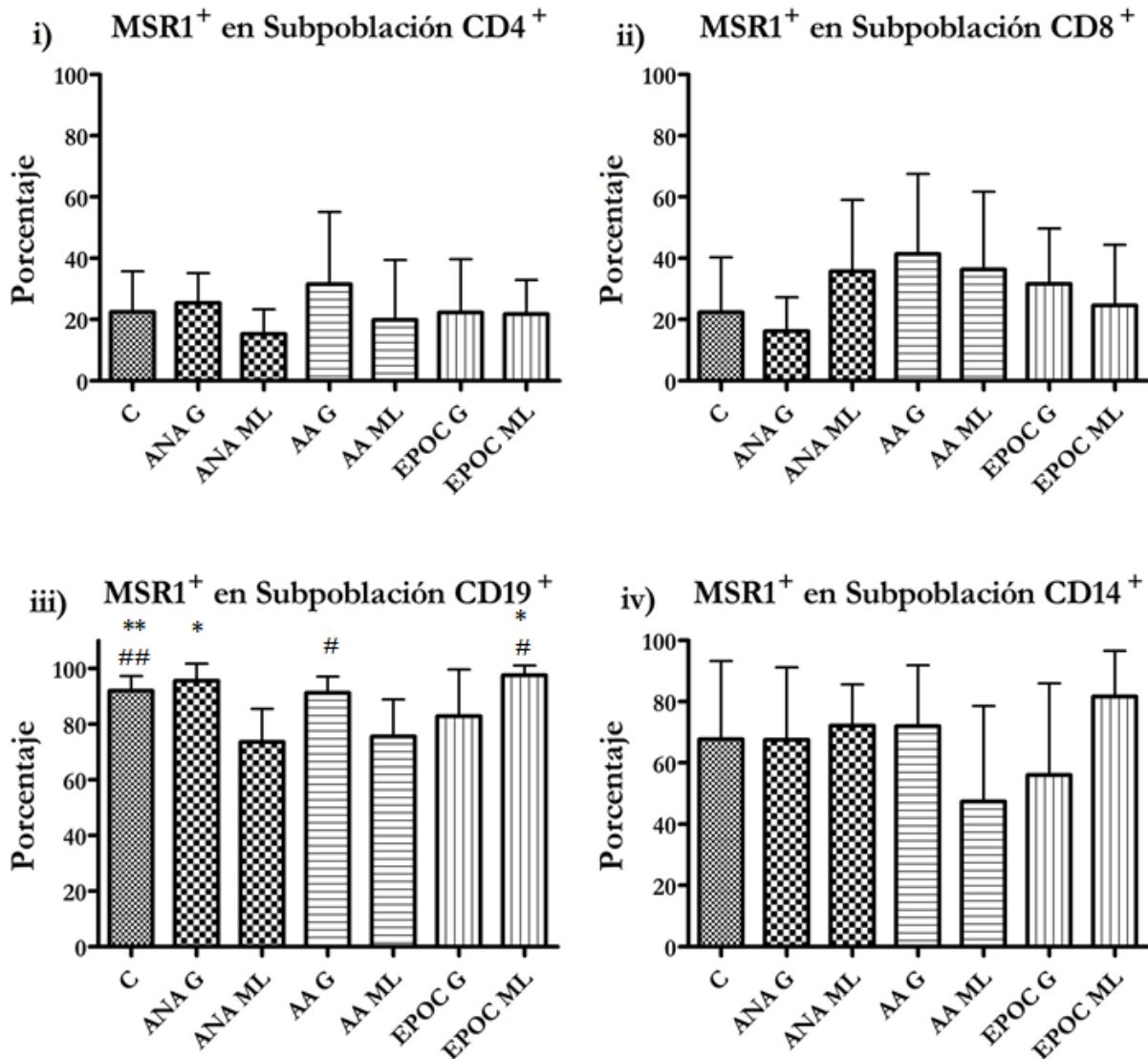


Figura 19B: Expresión de MSR1⁺ en subpoblaciones celulares analizadas en sangre completa y por subgrupos de gravedad de enfermedad. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve. i) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD4⁺. ii) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD8⁺. iii) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD19⁺. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo indicado y ANA ML. **Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre el grupo indicado y ANA ML. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y AA ML. ##Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo indicado y AA ML. iv) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD14⁺.

Por otro lado, en el análisis de las PBMC aisladas hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células $\text{MSR1}^+\text{CD4}^+$ entre los grupos clínicos ANA y AA respecto a los que padecían de EPOC. Los valores del grupo con EPOC ($51,17 \pm 12,70 \%$) fueron mayores comparados con ambos grupos con asma (grupo ANA: $40,27 \pm 7,64 \%$, $p=0,0262$; grupo AA $37,03 \pm 8,77 \%$, $p=0,0047$) (Figura 20A).

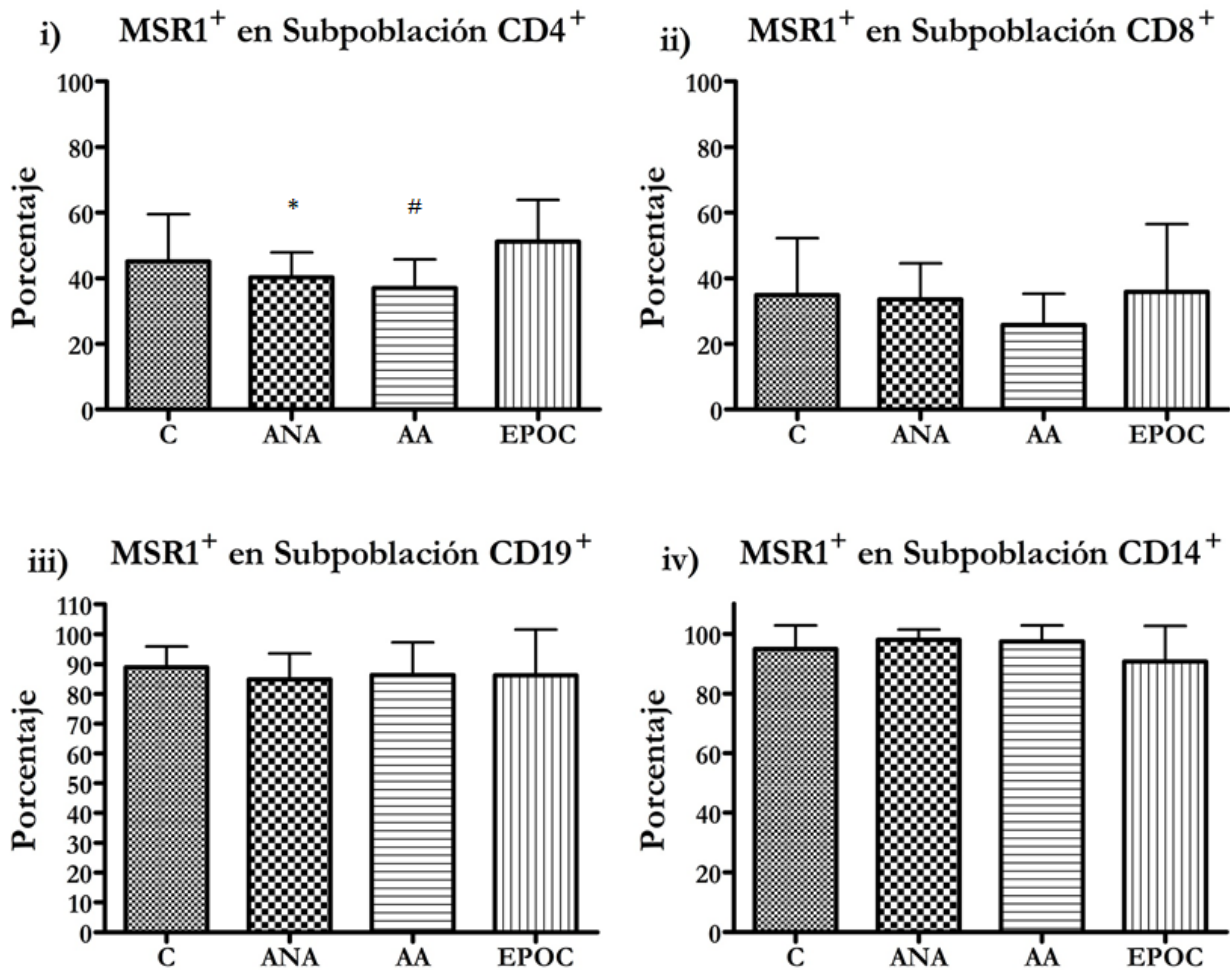


Figura 20A: Expresión de MSR1^+ en subpoblaciones celulares analizadas en PBMC y por fenotipos clínicos. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve. i) Porcentaje de la media de las células $\text{MSR1}^+\text{CD4}^+$ por fenotipos clínicos. ii) Porcentaje de la media de las células $\text{MSR1}^+\text{CD8}^+$ por fenotipos clínicos. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y el grupo EPOC. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el grupo indicado y el grupo EPOC. iii) Porcentaje de la media de las células $\text{MSR1}^+\text{CD19}^+$ por fenotipos clínicos. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar del grupo con EPOC. iv) Porcentaje de la media de las células $\text{MSR1}^+\text{CD14}^+$ por fenotipos clínicos. La escala supera el 100 % debido a la alta desviación estándar del grupo con EPOC grave. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar de algunos de los grupos.

Al realizar el estudio por gravedad, se observaron diferencias significativas en el caso de los linfocitos T $CD4^+$ (Figura 20Bi) y linfocitos B marcados con MSR1 (Figura 20Biii). Las células $MSR1^+CD4^+$ se encontraban aumentadas en los pacientes con EPOC grave ($53,70 \pm 7,50 \%$) al compararlos con el grupo con AA grave ($39,87 \pm 9,43 \%$, $p=0,0185$). Por otro lado, las células $MSR1^+CD19^+$ se encontraron disminuidas en los pacientes con ANA moderada-leve ($79,32 \pm 7,78 \%$) con respecto al grupo C ($88,88 \pm 6,95 \%$) y con respecto a los pacientes ANA con diagnóstico grave ($91,40 \pm 3,25 \%$) ($p=0,0200$ y $0,0105$, respectivamente).

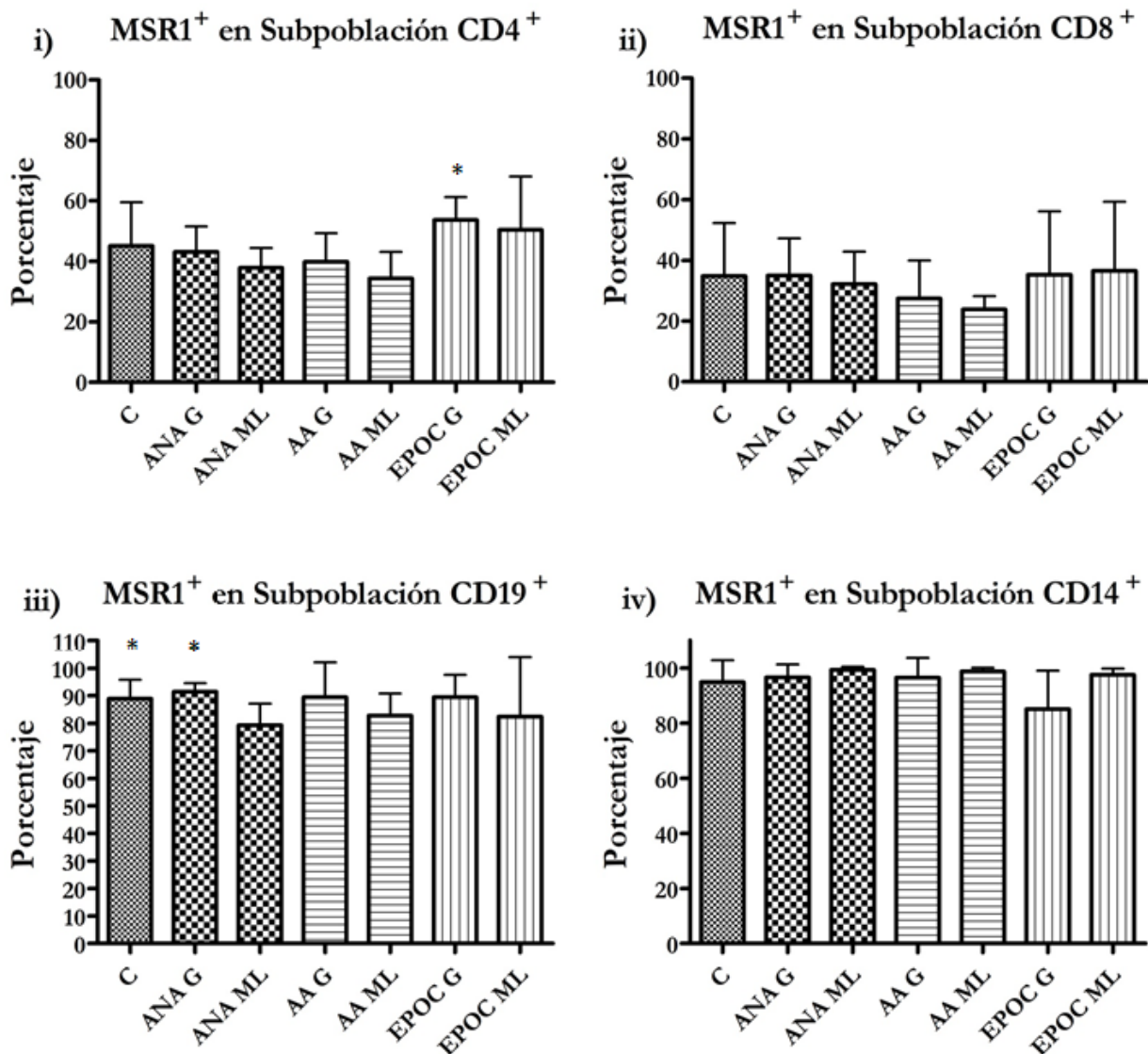
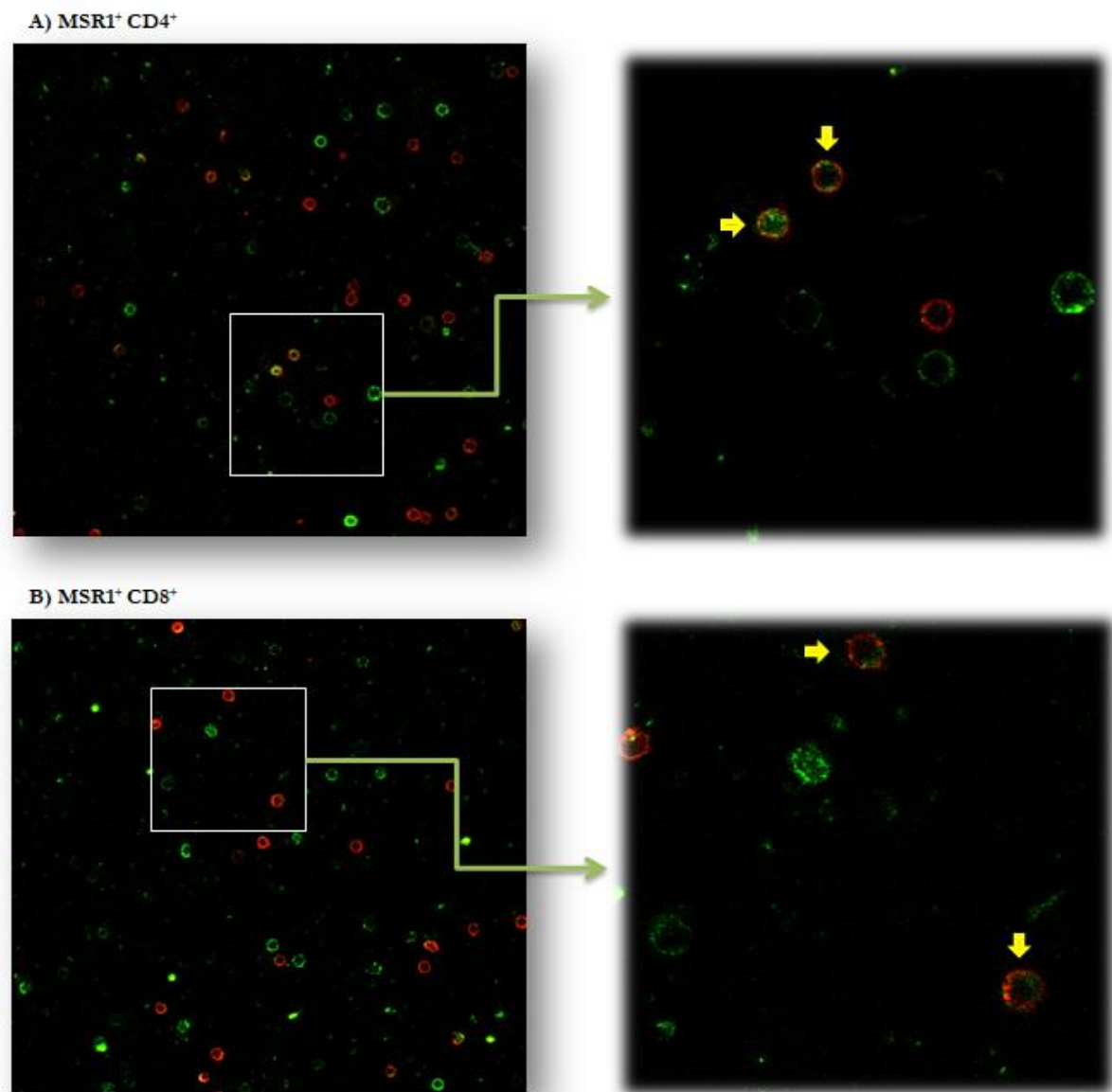


Figura 20B: Expresión de MSR1⁺ en subpoblaciones celulares analizadas en PBMC y por subgrupos de gravedad de enfermedad. G: diagnóstico grave, ML: diagnóstico moderado-leve. i) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD4⁺. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y AA G. ii) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD8⁺. iii) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD19⁺. *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grupo indicado y ANA ML. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar de algunos de los grupos. iv) Porcentaje de la media de las células MSR1⁺CD14⁺. La escala supera el 100 % debido a la desviación estándar de algunos de los grupos.

6.2. Análisis de MSR1 por microscopía confocal

Además del análisis por citometría de flujo, se visualizó por microscopía confocal la expresión de MSR1 en las distintas subpoblaciones analizadas en PBMC en suspensión: linfocitos T $CD4^+$, linfocitos T $CD8^+$, linfocitos B ($CD19^+$) y monocitos ($CD14^+$) (Protocolo detallado en el apartado 13.2 de Materiales y Métodos). Así se confirmó la localización de MSR1 en la membrana celular de los distintos tipos celulares estudiados, mediante imágenes que demuestran la colocalización de los marcadores en el mismo tipo celular. En la Figura 21 se muestran las imágenes de un ejemplo representativo de los resultados obtenidos, en la que se puede comprobar la tinción conjunta del marcador de cada población (en rojo) y la de MSR1 (en verde) en algunas células. Con estos resultados, se demuestra la presencia de MSR1 en la membrana de las subpoblaciones estudiadas de PBMC.



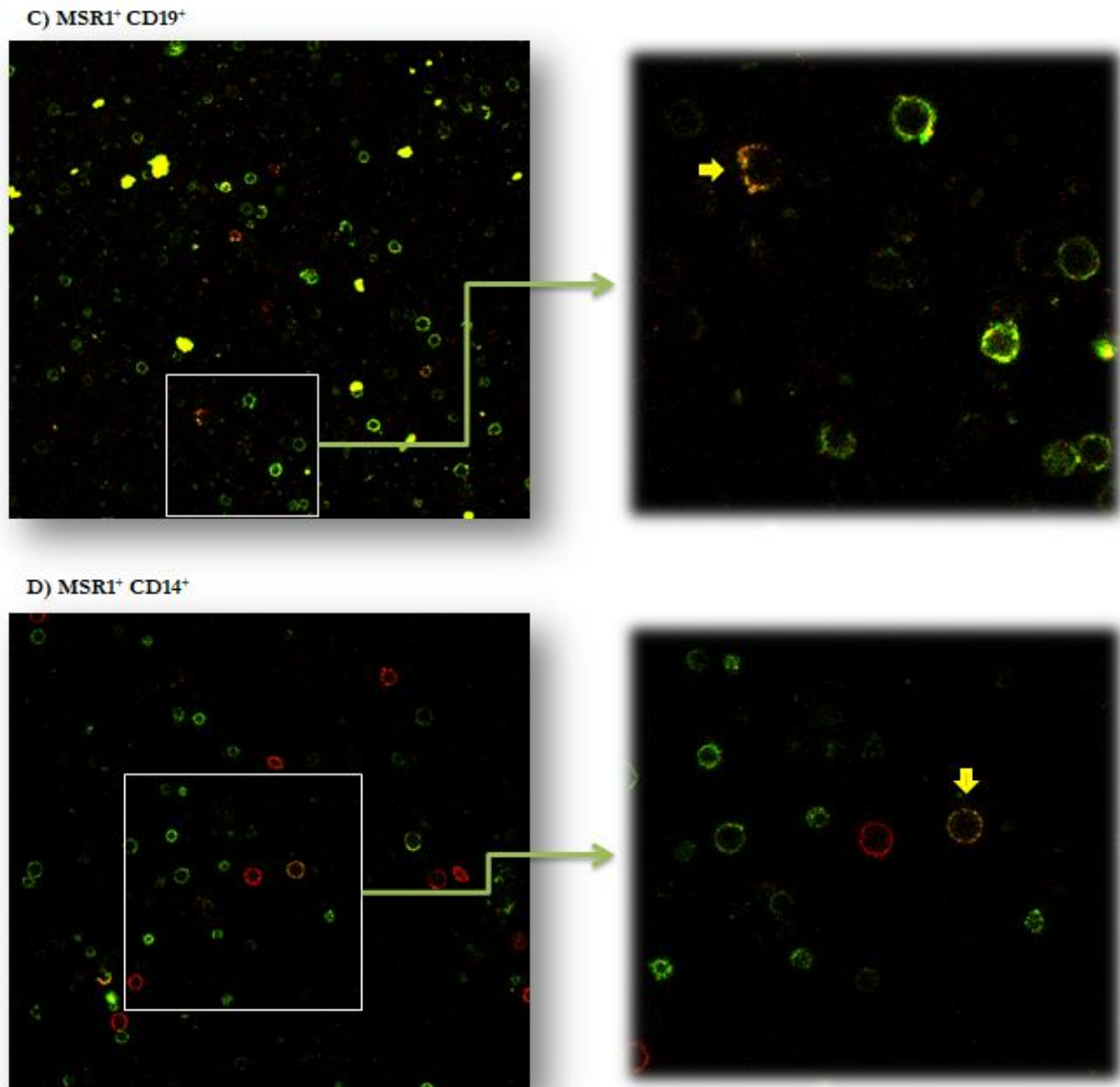


Figura 21: Ejemplo representativo de una muestra marcada con fluorescencia para las subpoblaciones de PBMC A) CD4⁺ B) CD8⁺ C) CD19⁺ y D) CD14⁺ y la proteína MSR1. Visualización por microscopía confocal. Las imágenes de la izquierda se realizaron con un objetivo 40X y las imágenes de la derecha con un zoom 2X. En verde, se marca MSR1⁺; en rojo, se indica el marcaje de cada subpoblación celular; en amarillo, se marca la colocación MSR1⁺/subpoblación celular correspondiente. La fecha amarilla indica las células con doble marcaje.

DISCUSIÓN

El asma y la alergia son enfermedades respiratorias inflamatorias crónicas resultado de interacciones complejas entre la genética y el ambiente. Está aceptada la relación entre estos desordenes respiratorios con la inflamación de vías respiratorias de tipo 2 o Th2, caracterizada por niveles elevados de eosinófilos, IgE y citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Un número creciente de terapias para el asma, aún en desarrollo clínico, son las terapias biológicas que se dirigen específicamente a mediadores de inflamación Th2 (Arron, Scheerens y Matthews, 2013). Sin embargo, gran cantidad de evidencias han demostrado la alta heterogeneidad que existe en cuanto a la naturaleza e intensidad de la inflamación de las vías respiratorias. Hay una necesidad real de mejorar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad asmática. Aunque utilizar un único biomarcador para el control clínico es lo ideal, para un mejor manejo de estas enfermedades se necesita entender la heterogeneidad y los mecanismos relacionados. Debido a esto, se está extendiendo el concepto de endotipo: subtipo de una enfermedad que se define funcional y patológicamente por un mismo mecanismo molecular. Sin embargo, cada vez más se piensa que los endotipos establecidos hasta ahora serían más bien endotipos complejos constituidos por varios mecanismos que no pueden ser separados en un único mecanismo molecular. El endotipo Th2 de alergia y asma es un endotipo complejo que incluye células linfoides innatas, células Th2, eosinofilia en tejidos y producción de IgE (Agache *et al.*, 2015). Como ya se ha comentado, se están haciendo muchos esfuerzos para definir nuevas terapias biológicas contra dianas específicas que definen el asma mediada por la inflamación Th2, sin embargo, un número importante de pacientes asmáticos presentan baja inflamación Th2 o una respuesta inflamatoria no Th2. Para esta inflamación no Th2 aún no hay mucha información y por lo tanto, existe una necesidad real de búsqueda de nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas.

Como consecuencia de esto, un área en auge de los últimos años es la búsqueda de nuevas estrategias para el manejo del asma, como es el desarrollo de las denominadas terapias biológicas asociadas a un endotipo, cuya diana es una única vía molecular, que podrían resolver problemas clínicos individualizados de la enfermedad. Para que sea clínicamente relevante, el endotipo debería relacionarse con biomarcadores validados y que correspondan a un mecanismo implicado (Agache *et al.*, 2015). El objetivo de un biomarcador es identificar el endotipo de la enfermedad, predecir el comienzo y el pronóstico de la enfermedad, medir la exposición, monitorizar la respuesta al tratamiento o prever una evolución desfavorable (Agache, 2013). Un biomarcador puede ser la firma de una vía compleja implicada en un endotipo concreto de una enfermedad o, una molécula clave de ese endotipo. En relación a esto, las tecnologías de análisis masivo u *ómicas*, como la transcriptómica, la proteómica, la lipidómica y la metabolómica, están siendo altamente útiles para el descubrimiento de nuevos biomarcadores y para discriminar fenotipos

transcriptómicos en sangre, esputo, lavados broncoalveolares o muestras de tejido derivado de los órganos afectados, que han sido identificados y probados como efectivos para refinar la clasificación del asma y la alergia y para así, guiar a las terapias dirigidas. Aun así, falta una explotación total de la riqueza de información suministrada sobre el asma y la alergia por este tipo de estudios complejos (Bérubé y Bossé, 2014; Wagener *et al.*, 2013).

La cuantificación de los niveles de expresión génica en tejidos y tipos celulares relacionados con la enfermedad utilizando tecnologías de transcriptómica y metabolómica han generado nuevas hipótesis sobre la patogénesis del asma y han identificado nuevas dianas terapéuticas para tratar dicha enfermedad y sus exacerbaciones, con beneficios y limitaciones que han sido revisados extensamente (Wagener *et al.*, 2013). Toda esta información necesita ser contrastada y validada en muestras que sean fáciles de procesar. En este sentido, recientemente se ha descrito la expresión génica en esputo y sangre de niños y adultos en relación con asma grave y moderada (Yan *et al.*, 2015). Con esta misma idea, esta Tesis trata de validar algunos de estos resultados, en PBMC, en concreto de 94 genes que han sido descritos previamente como posibles biomarcadores para discriminar los fenotipos del asma y la alergia. Recientemente y como parte de esta Tesis, hemos publicado un grupo de genes expresados diferencialmente en muestras de sangre periférica de pacientes con asma no alérgica (Th2-baja) y asma alérgica (Th2-alta), asociándose algunos de estos genes con la gravedad de estas enfermedades (Baos *et al.*, 2017).

Teniendo en mente este objetivo, en primer lugar y después de un análisis exhaustivo de posibles biomarcadores descritos en diferentes tejidos y tipos celulares, se seleccionaron 94 genes (Tabla 11), incluyendo los que más se repetían en la bibliografía científica y otros que fueron solo descritos por nuestro grupo (Aguerri *et al.*, 2013) (ver Apartado 8.1 de Materiales y Métodos), para validarlos en muestras de PBMC de 104 sujetos clasificados en 4 fenotipos clínicos: sujetos controles sanos, pacientes asmáticos no alérgicos, asmáticos alérgicos y alérgicos no asmáticos. Las diferencias principales entre los grupos clínicos se describen en la Tabla 9. Es importante destacar que la población de estudio está compuesta entre otros, por un grupo con inflamación Th2-baja (denominada ANA) caracterizada por niveles bajos de IgE total, pruebas cutáneas negativas, así como una baja presencia de eosinófilos en sangre periférica. Esta distinción de grupos de pacientes en la respuesta Th2 está poco detallada o estudiada habitualmente en la literatura científica.

El primer análisis global de expresión génica por el método no supervisado PCA (Figura 4), mostró la posibilidad de agrupar los cuatro grupos clínicos según la expresión de los 94 genes seleccionados. En concreto, la comparación entre dos grupos por análisis jerárquicos sin

supervisión pudo diferenciar el 100 % de las muestras de pacientes asmáticos (alérgicos o no alérgicos) de los sujetos C (Figura 5A y B). La sensibilidad y especificidad para discriminar las muestras de AR de las de los sujetos C fue 92,86 y 96,39 %, respectivamente (Figura 5C). Estos valores fueron algo menores en la discriminación de los fenotipos clínicos entre sí (ANA *vs.* AA: sensibilidad 66,60 % y especificidad 61,50 %; ANA *vs.* AR: sensibilidad 78,57 % y especificidad 90 %; AA *vs.* AR: sensibilidad 78,57 % y especificidad 88,40 %). Estos resultados recalcan la buena selección de genes realizada y muestran la posibilidad de encontrar biomarcadores génicos específicos para diferenciar fenotipos clínicos en muestras derivadas de sangre periférica.

Los análisis de expresión génica diferencial, funcional y de interacción proteica que compararon los distintos grupos clínicos dieron resultados estadísticamente significativos. En primer lugar, los grupos con sujetos alérgicos (asmáticos y no asmáticos) fueron los que mostraron un mayor número de genes diferenciales (69 en los que padecían asma y 66 en los que no) al compararlos con los sujetos C. Veintiséis genes tuvieron una expresión estadísticamente significativa en el grupo con ANA comparado con el C. Para entender mejor estos resultados, se realizaron análisis con respecto a la gravedad de la enfermedad en los grupos con sujetos con asma. Estos resultados revelaron que *IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1* y *SERPINB2* se sobreexpresaban y *CHI3L1*, *CPA3*, *IL-8*, *IL-1R2* y *PI3* se encontraban reprimidos (Tabla 13A) en los pacientes con ANA grave comparado con los sujetos C. En los pacientes con AA, 35 genes estaban reprimidos al compararlos con los sujetos C al clasificar a los sujetos según la gravedad del asma (Tabla 13B), y entre ellos se encontraban los mismos 5 genes reprimidos fuertemente en el grupo de pacientes con ANA grave. Los análisis funcionales y la red de interacción proteica de estos genes se resumen en las Tablas 14, 15 y 16 y la Figura 6. El resultado más relevante fue que el valor de enriquecimiento del análisis de asociación de funciones fue mayor en los 2 grupos con sujetos alérgicos que en el grupo con ANA. La Figura 6 refleja las interacciones proteicas de cada grupo, mostrando la complejidad y la alta conexión de las 2 condiciones con alergia además de mostrar una red algo más clara en el grupo con ANA. De todos estos resultados, se puede concluir que la mayoría de los genes que se han analizado en este estudio y por lo tanto, que se encuentran en la literatura, proceden de estudios de enfermedades alérgicas y de Th2 alto y por eso el número mayor de genes diferenciales, el mayor valor de enriquecimiento y la alta conexión se da entre los fenotipos AA y AR. De nuevo esto evidencia la importancia de encontrar biomarcadores nuevos del fenotipo ANA.

1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS BIOMARCADORES MÁS RELEVANTES

A partir de los resultados de este estudio génico, se seleccionaron los candidatos más relevantes para ser valorados a nivel proteico. Se analizaron los que se observaron importantes a nivel génico en el asma y en su gravedad y, ya que el objetivo es encontrar biomarcadores fáciles de analizar, se utilizaron técnicas simples como son el ELISA o el *western blot*. Como ya se ha comentado anteriormente, un biomarcador se define como una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, de procesos patológicos o de la respuesta farmacológica de una intervención terapéutica (*Biomarkers Definitions Working Group*, 2001). El biomarcador ideal debería ser simple de realizar, no invasivo, reproducible y barato (Gao *et al.*, 2005). En este trabajo, se ha explorado en profundidad la relevancia de la expresión génica y proteica de potenciales marcadores, a través del estudio de las diferencias en sus niveles de expresión y del análisis por curvas ROC de su expresión individual y combinada, con el fin de demostrar su habilidad para discriminar la enfermedad asmática y alérgica y su gravedad, utilizando muestras de sangre periférica. Estos biomarcadores fueron: MSR1, SERPINB2, POSTN, PHLDA1, IL-10, CHI3L1, PI3 e IL-8.

1.1. Biomarcador MSR1

El gen más sobreexpresado de la condición ANA grave *vs.* grupo C de nuestros resultados fue *MSR1*. Este gen codifica los receptores “basura” de macrófagos de clase A, también llamados SR-A o CD204, que incluyen 3 tipos (1, 2 y 3) generados por el *splicing* alternativo de este gen. Estos receptores o isoformas son glicoproteínas triméricas integrales de membrana específicas de macrófagos implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos asociados con macrófagos incluyendo la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y la defensa del huésped. Aunque MSR1 se consideraba un receptor específico de macrófagos (porque principalmente se encontró en macrófagos y no en monocitos ni en sus células precursoras) (Naito *et al.*, 1991; Takahashi, Takeya y Sakashita, 2002; Tomokiyo *et al.*, 2002), en estudios posteriores se ha descrito en otros tipos de células (especialmente en tejidos) como células vasculares del músculo liso, células endoteliales, células epiteliales pulmonares humanas, microglia, astrocitos y fibroblastos embrionarios de ratón (Kelley *et al.*, 2014). Este hecho aumenta el potencial patológico y fisiológico de este receptor y destaca su papel primordial en la salud y la enfermedad. Su expresión génica se ha descrito en muestras de sangre periférica en pocas ocasiones (Masafumi *et al.*, 2008; Piechota *et al.*, 2012) y el estudio de su expresión proteica en muestras periféricas nunca ha sido abordado hasta el momento. Por lo tanto, en este estudio se demostraron diferencias en los niveles de MSR1 en PBMC por *western blot* y se estudió su presencia en distintas

subpoblaciones celulares de PBMC por citometría de flujo (Figura 17, 18, 19 y 20) y por microscopía confocal (Figura 21).

En este trabajo, se ha intentado validar resultados previos de nuestro laboratorio con respecto a MSR1 (Aguerri *et al.*, 2013). Este gen se eligió por ser uno de los genes más sobreexpresados en PBMC de una población de sujetos con AA, aunque nunca antes se había asociado con la enfermedad asmática. Aquí, de nuevo se confirmó que la expresión de este gen es una de las más diferenciales en la enfermedad asmática, destacando también la relevancia de este gen en la gravedad de los pacientes con ANA (Tabla 13A) (Baos *et al.*, 2017). Curiosamente, varios trabajos han asociado la alta expresión de este receptor con otra enfermedad respiratoria compleja (EPOC) en biopsias y muestras de tejidos (Thomsen *et al.*, 2011; Ohar *et al.*, 2010) y han descrito la posibilidad de que mecanismos que llevan a la acumulación en el pulmón de macrófagos con este marcador podrían contribuir al enfisema grave y a EPOC (Kaku *et al.*, 2014).

Debido a la relevancia de estos resultados y sabiendo la poca información que había de MSR1 en PBMC, se decidió analizar el nivel de su expresión proteica por *western blot* en proteína extraída de PBMC. Los análisis por *western blot* (Figura 10A, 10B, 11A y 11B) mostraron que el anticuerpo humano específico frente a MSR1 reconocía un perfil diferente de proteínas en sujetos sanos al compararlo con los pacientes ANA. Curiosamente, es en la expresión de la banda superior donde se encontró una correlación importante entre la expresión proteica y el % FEV₁ en los pacientes con ANA, y sobre todo en los subgrupos por gravedad. Estos datos confirmaron la expresión proteica de MSR1 en PBMC, reseñando interesantes diferencias entre sujetos sanos y asmáticos.

Ante el incremento observado en nuestros resultados de MSR1 en el fenotipo clínico con ANA y la necesidad de información sobre la expresión de MSR1 en las poblaciones celulares, se decidió hacer un estudio para intentar caracterizar la población o poblaciones celulares que expresaban este receptor a nivel de sangre periférica. Además, considerando los datos previamente publicados a nivel histológico y génico en muestras de pacientes con otra patología respiratoria (EPOC) (Thomsen *et al.*, 2011; Ohar *et al.*, 2010; Kaku *et al.*, 2014), se decidió diseñar un estudio en el que se analizaran muestras de sujetos C y de pacientes con ANA, con AA y un último grupo de pacientes con EPOC. En este estudio se midieron los niveles totales de expresión de MSR1 en sangre completa y en la fracción de PBMC, así como en distintas subpoblaciones celulares: linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), linfocitos B y monocitos, por microscopía confocal y citometría de flujo. Con la técnica de microscopía confocal se observó la localización de la proteína MSR1 en la superficie de las 4 subpoblaciones celulares analizadas, como se muestra en la Figura 21. Por otro lado, los resultados obtenidos por citometría de flujo fueron más informativos. Como

muestran las Figuras 17 y 18, la expresión total de MSR1 fue considerable en todos los grupos de estudio tanto en sangre total como en la fracción de PBMC, aunque solo en este último caso se encontraron diferencias con significación estadística entre los grupos analizados, siendo el grupo de pacientes con EPOC el que mostró los mayores niveles de expresión de MSR1 (Figura 18A), corroborando así lo descrito por otros autores en la literatura científica. Al profundizar en el estudio y analizar las diferencias según la gravedad (Figura 18B), los pacientes con ANA grave tuvieron un porcentaje de MSR1 total mayor que el grupo C y que los pacientes con diagnóstico moderado-leve. Los pacientes con EPOC grave y moderada-leve también mostraron una mayor expresión media de MSR1 que el grupo de sujetos sanos. Además, el grupo de los pacientes con EPOC grave expresó los mayores porcentajes de MSR1, con diferencias significativas respecto a los pacientes con AA grave. Todo esto parece corroborar la importancia de MSR1 en la EPOC, pero además, es una prueba más de la importancia de este biomarcador en los pacientes con ANA y en su gravedad.

Al analizar la expresión total de MSR1 en las subpoblaciones celulares (Figura 18C), se encontró que en el caso de los pacientes con AA la expresión total de MSR1 se justificaba con los tipos celulares estudiados, mientras que en los pacientes con ANA había un porcentaje del 12,64 % que correspondía a algún tipo celular no analizado en este estudio. Curiosamente, ha sido descrita la expresión de MSR1 en fibrocitos (Bianchetti *et al.*, 2012), un tipo celular controvertido, localizado en muestras de sangre periférica, que ha sido difícil de caracterizar y que se ha asociado recientemente con el asma grave, sus exacerbaciones y el asma obstructiva crónica (Wang *et al.*, 2015). Además, se han definido por Lo *et al.* (2015), las diferencias entre el número de fibrocitos circulantes en pacientes con asma grave de los que padecen de asma moderada-leve. Por lo tanto, sería interesante demostrar la expresión diferencial de MSR1 en fibrocitos de pacientes con ANA en muestras de sangre periférica.

En concreto en el estudio por subpoblaciones celulares, los linfocitos B (CD19⁺) expresaban en un mayor porcentaje MSR1⁺, seguidas por los monocitos (CD14⁺). Los linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) fueron los que menos expresaron MSR1 (Figura 19A y 20A). Las diferencias significativas entre los fenotipos clínicos se observaron en los linfocitos T CD4⁺ (Figura 20Ai) y los linfocitos B (Figura 19Biii y 20Biii). Las diferencias en los porcentajes de expresión de MSR1 observadas en los linfocitos T CD4⁺ fueron relevantes en las comparaciones de los grupos clínicos totales analizadas en PBMC, mientras que las diferencias en el porcentaje de MSR1 en los linfocitos B parecen estar relacionadas con los subgrupos de gravedad. Estos resultados muestran evidencias novedosas de las poblaciones celulares de PBMC que podrían tener implicación en la expresión diferencial de MSR1 en los pacientes con ANA, AA y EPOC, y en su gravedad.

Todos estos datos demuestran que MSR1 se expresa en múltiples tipos celulares en sangre periférica y parece que de una forma diferente atendiendo al fenotipo clínico analizado. Por tanto, aunque sería interesante un análisis más exhaustivo de la expresión proteica de MSR1 en sangre periférica, considerando todos estos resultados con los anteriormente publicados en EPOC, podemos decir que MSR1 sería un muy buen candidato como biomarcador de la gravedad en varias enfermedades respiratorias.

1.2. Biomarcador SERPINB2

SERPINB2 es un miembro del grupo de inhibidores de la familia serín proteasa, un grupo de enzimas que inhiben a la proteasa catépsina G de neutrófilos y la quimasa de mastocitos, protegiendo el tracto respiratorio del daño causado por enzimas proteolíticas. Por eso, estas enzimas se han descrito como potentes marcadores de diagnóstico del ataque asmático (Zou *et al.*, 2002). Se ha detectado en monocitos/macrófagos, fibroblastos y derivados, queratinocitos, células endoteliales y como una proteína potencial de eosinófilos, con un papel en inflamación y remodelado asociado a infecciones parasitarias, además de a enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, a infección respiratoria de etiología viral y a respuestas del huésped contra tumores y metástasis *in vivo* (Swartz *et al.*, 2004). Previene la activación de la plasmina y promueve la formación de fibrina. Sin embargo, que SERPINB2 funcione principalmente en el depósito de fibrina extracelular es incierto, ya que es mayoritariamente de localización intracelular. Por otro lado, la regulación de la inflamación Th1 se ha descrito como una función fisiológica de SERPINB2 que si se desregula puede ocasionar enfermedades relacionadas con la inflamación (Schroder *et al.*, 2010). Se ha descrito que SERPINB2 se encuentra sobreexpresada específicamente debido a IL-13 en células epiteliales de las vías respiratorias (Woodruff *et al.*, 2007; Woodruff *et al.*, 2009) y que su expresión, junto con POSTN y CLCA1 (el accesorio del canal de cloruro 1), permite la clasificación del asma en Th2-alta o Th2-baja, teniendo cada subtipo unas características inflamatorias específicas, de remodelación y de respuesta al tratamiento (Woodruff *et al.*, 2009). Sin embargo, recientemente la expresión génica de SERPINB2 no se ha confirmado como diferencial en células de esputo de pacientes asmáticos (Peters *et al.*, 2014). En nuestro estudio, POSTN y CLCA1 no pudieron ser analizados ya que no se detectaron, pero la expresión génica de SERPINB2 estaba aumentada y asociada fuertemente con la condición asmática, sobre todo en el asma no alérgica grave (Tabla 13A), mientras que a nivel proteico, los niveles fueron menores en los grupos con asma que en los sujetos controles sanos y pacientes con AR (Figura 10C). De hecho, en nuestro estudio se encontró una fuerte correlación negativa entre la expresión génica y proteica de SERPINB2 en el grupo AR (Tabla 28C). Sin embargo, al estudiar los niveles proteicos de SERPINB2 (Figura 11C) entre los

subgrupos de gravedad, los niveles de pacientes con ANA grave fueron estadísticamente mayores que los de diagnóstico moderado-leve. Además, la expresión génica de SERPINB2 correlacionó con los parámetros de funcionalidad (en concreto con el porcentaje de FEV₁, y el número y el porcentaje de eosinófilos) en el grupo con ANA moderada-leve (Tabla 29). Todos estos datos, apuntan a que SERPINB2 podría ser un interesante candidato como biomarcador diferencial para fenotipos de asma no alérgica en PBMC. Hay que destacar que hasta lo que nosotros hemos podido comprobar, es la primera vez que se estudia la expresión proteica de SERPINB2 en muestras de sangre periférica, habiéndose solo estudiado en lavados broncoalveolares (Bhakta y Woodruff, 2011).

1.3. Biomarcador POSTN

La *periostina*, o *POSTN*, es un gen que da lugar a una proteína de la matriz extracelular producida por células del epitelio bronquial al ser estimuladas por IL-4 e IL-13 (Takayama *et al.*, 2006), habiéndose demostrado la inducción de este gen por IL-13 en lavados bronquiales de pacientes asmáticos (Woodruff *et al.*, 2007). La expresión de *POSTN* en tejido bronquial ha demostrado ser un biomarcador de la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias (Jia *et al.*, 2012), mientras que los niveles de periostina en suero se han relacionado con la respuesta al tratamiento anti-IL-13 en pacientes con asma moderada-leve (Corren *et al.*, 2011). Además, los niveles proteicos de *POSTN* en esputo se han asociado con el asma eosinofílica grave (Bobolea *et al.*, 2015). Este biomarcador no pudo ser detectado a nivel génico en nuestro estudio por falta de resolución de la técnica utilizada, pero su expresión proteica, arrojó resultados muy interesantes. Los mayores niveles se encontraron en el grupo ANA y los menores niveles fueron para el grupo AR. Además en los pacientes con ANA y diagnóstico grave, los niveles de expresión proteica de *POSTN* fueron los más altos (Figura 10I y 11I). Aquí arrojamamos nueva información sobre *POSTN*, uno de los biomarcadores más relevantes en la literatura científica, sobre todo en relación a la respuesta Th2 mediada por IL-13 (Parulekar, Atik y Hanania, 2014) y asociado clásicamente con la inflamación eosinofílica (Th2-alta) en el tejido bronquial y en esputo, proponiéndolo como biomarcador en suero del asma no alérgica (no Th2 o Th2-baja).

1.4. Biomarcador PHLDA1

Otro gen y proteína importante que se confirmó y asoció positivamente con la gravedad del asma en el fenotipo sin alergia fue *PHLDA1*. *PHLDA1*, o miembro 1 de la familia A con homología al dominio de *plesktrin*, es un gen que codifica una proteína nuclear rica en prolina e histidina que se ha descrito como un marcador de células madre epiteliales del intestino delgado y grueso humano

(Sakthianandeswaren *et al.*, 2011) y se ha propuesto como biomarcador para la detección y/o terapia del cáncer gástrico (Zhao, Lu y Liu, 2015), pero nunca antes se ha asociado con la enfermedad asmática. Sin embargo, en nuestro estudio, los niveles proteicos de PHLDA1 muestran una tendencia en la que los valores en el grupo con ANA son los más altos (Figura 10D y 11D). Además, la correlación entre la expresión génica y proteica de PHLDA1 en los pacientes ANA graves fue de la más fuerte con un coeficiente de correlación de 0,998 ($p= 0,0400$). También es destacable la correlación entre la expresión génica de MSR1 y PHLDA1 en el grupo ANA, y en concreto en los pacientes con ANA grave y AA grave (Tabla 28A y B). Hasta lo que hemos podido encontrar en la bibliografía científica, la asociación de este biomarcador con el asma sería un hallazgo totalmente novedoso.

1.5. Biomarcador IL-10

IL-10, o interleucina 10, es una citocina producida principalmente por monocitos y en menor medida, por los linfocitos. Esta citocina tiene efectos dispares en la inmuno-regulación y la inflamación (Mingomataj y Bakiri, 2016). Reprime la expresión de citocinas proinflamatorias, de antígenos MHC de clase II y de moléculas co-estimuladoras en macrófagos y DC. También aumenta la supervivencia de linfocitos B, su proliferación y la producción de anticuerpos. Esta citocina puede bloquear la actividad del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) y está implicada en la regulación de la vía de transmisión de señales de JAK-STAT (Quinasa Janus/transductor de señal y activador de transcripción). Se la considera una de las citocinas reguladoras principales, junto con TGF- β , y se ha relacionado extensamente con las enfermedades asmáticas y alérgicas (Palomares *et al.*, 2014). Es interesante cómo recientemente su papel en diferentes enfermedades incluyendo el asma y la alergia, se ha revisado (Mingomataj y Bakiri, 2016) y se ha descrito como un potencial interruptor de la respuesta inmune. Esta revisión indica que IL-10 se produce mayoritariamente durante condiciones inmunes transitorias y que el efecto persistente asociado a IL-10 es una indicación o predicción de esa inmunidad a modo de interruptor. Mingomataj y Bakiri (2016) enfatizan en la idea de que cualquier manipulación de IL-10 se debería utilizar con efectores inmunes co-estimuladores necesarios para determinar la desviación apropiada durante el tratamiento de las respectivas patologías. En esta Tesis, la expresión génica de *IL-10* estaba muy incrementada en el asma sin alergia comparada con el grupo C, sobre todo en los pacientes con diagnóstico grave, pero disminuida en los pacientes con AR (Tabla 13). Además, en los pacientes con ANA moderada-leve su expresión génica correlacionó negativamente con % FEV₁ (Tabla 29). *IL-10* parece ser un potencial biomarcador interesante de la condición asmática. A nivel proteico, no se encontraron diferencias significativas, pero la tendencia fue similar que la génica,

con niveles mayores en el grupo AA, ANA y AR que en el grupo C, y con unos valores mayores en los grupos con asma grave (Figura 10F y 11F).

1.6. Biomarcador CHI3L1

CHI3L1 se encontró extremadamente reprimido en los tres grupos clínicos comparado con los sujetos sanos. *CHI3L1* (o quitinasa 3 similar a la 1) es un gen que codifica una glicoproteína miembro de la familia 18 de las hidrolasas de enlaces glucosídicos (también denominada YKL-40). Esta proteína carece de actividad quinasa y es secretada por macrófagos activados, condrocitos, neutrófilos y células del líquido sinovial. Se cree que juega un papel en los procesos de inflamación y de remodelado tisular (Lee *et al.*, 2011), y se ha revisado su rol como biomarcador versátil en los mecanismos de transmisión de señales regulados por YKL-40 (Prakash *et al.*, 2013). Se ha demostrado su incremento en el suero de pacientes asmáticos (Chupp *et al.*, 2007) y sus niveles se han correlacionado con la gravedad de la enfermedad (Ober *et al.*, 2008; Konradsen *et al.*, 2013). Específicamente, se ha sugerido que los miembros de la familia de las quitinasas podrían estar implicados en el desarrollo de la fibrosis y la remodelación de las vías respiratorias (Ober *et al.*, 2008). Esto correlaciona con nuestros resultados a nivel proteico, en los que el grupo AA mostró niveles más altos que el grupo C, con valor estadísticamente significativo (Figura 10G). Además, existía una correlación destacable entre la expresión proteica de CHI3L1 y % FEV₁ en los pacientes con ANA moderada-leve (Tabla 29). Esto puede ir acorde con lo descrito anteriormente por Hinks *et al.* (2016), que encontraron correlaciones entre los niveles de YKL-40 y la inflamación mediada por neutrófilos, es decir presumiblemente en nuestro estudio, el fenotipo Th2-bajo o, lo que es lo mismo, el grupo con ANA analizado.

1.7. Biomarcador PI3

PI3, o el inhibidor de peptidasas 3, a nivel génico fue importante para discriminar los pacientes ANA del grupo C, además de a los pacientes de diagnóstico grave (Tabla 13). Por otro lado, su expresión génica se correlacionó negativamente con % FVC y % FEV₁ en los pacientes con AA de diagnóstico grave (Tabla 29). Estos resultados se correlacionan con la descripción reciente del efecto protector de *PI3* frente al asma adulto (Tsai *et al.*, 2016). *PI3* (también denominado trapina 2 o elafina) es un potente inhibidor de serín proteasas, que funciona como un péptido antimicrobiano y previene el daño excesivo en ambientes inflamatorios. Es expresado localmente por células epiteliales e inmunes como los macrófagos y las células Tγδ. Ya que este inhibidor tiene actividad antimicrobiana, además de antielastasa, se ha sugerido que su inactivación en el sistema de defensa del pulmón ocasionada por el alérgeno 1 del *Dermatophagoides pteronyssinus* o

Der p 1 podría aumentar la susceptibilidad a sufrir infección en los pacientes con inflamación alérgica (Brown *et al.*, 2003). PI3 juega un papel central en el control excesivo de la actividad de la elastasa de neutrófilos. Es además un modulador de un gran rango de parámetros que son críticos en la inflamación, aunque actúa con efectos duales, que se relacionan con la susceptibilidad o con la protección contra enfermedades inflamatorias e infecciones (Verrier *et al.*, 2012). Se ha descrito una asociación significativa entre polimorfismos de *PI3* y el riesgo de padecer síndrome de estrés agudo respiratorio (Tejera *et al.*, 2014). Los resultados proteicos no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, aunque sí una tendencia del grupo AR a tener los niveles más altos (Figura 10H).

1.8. Biomarcador IL-8

Por último lugar, destacar el gen *IL-8* que codifica la interleucina 8, miembro de la familia de quimiocinas CXC, cuya expresión se encontró reprimida y asociada a la gravedad de los pacientes con ANA y con AA. Esta quimiocina es uno de los mayores mediadores de la respuesta inflamatoria y muy importante en muchas funciones de neutrófilos, como la quimiotaxis y la supervivencia. Una producción alta de IL-8 por neutrófilos de sangre periférica podría primar a estas células a migrar a las vías respiratorias. Esta quimiocina es secretada por varios tipos celulares. Funciona como un quimio-atrayente y también es un potente factor angiogénico. Se cree que este gen juega un papel en la patogénesis de la bronquiolitis, una enfermedad común del tracto respiratorio causado por infección viral y que además, tiene un rol significativo en el daño pulmonar agudo, a través de la formación de complejos de autoanticuerpos anti-IL-8:IL-8. Estos complejos interactúan con los receptores IIa para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (FcγRIIa), causando entre otros posibles mecanismos, la apoptosis de neutrófilos (Allen *et al.*, 2013). Los niveles circulantes de IL-8 también pueden estimular a la médula ósea para liberar neutrófilos al torrente circulatorio (van Eeden *et al.*, 2000) y se ha descrito que en asma sin eosinofilia, los neutrófilos de la sangre periférica liberan niveles significativamente más altos de IL-8 que sujetos sanos o con asma eosinofílica (Baines *et al.*, 2010). Curiosamente, al investigar la interacción del epitelio de las vías respiratorias y el músculo liso se describió que YKL-40 podría estar implicado en la inflamación del asma por la inducción de IL-8 a través del epitelio, sugiriendo que la inhibición de la transmisión de señales de IL-8 podría ser una potencial diana terapéutica para la inflamación y remodelación del asma inducidas por YKL-40 (Tang *et al.*, 2013).

Todos estos datos, junto con los hechos de que la citocina IL-8 parece ser una de las proteínas diferenciales centrales en nuestros análisis (Figura 6) y que se asocia con la gravedad de los grupos con asma (Tablas 13A y B), justificaron el análisis de sus niveles proteicos. Las Figuras

10E y 11E muestran los niveles medios en suero de IL-8 en los grupos C, ANA, AA y AR. Curiosamente, los niveles más altos se observaron en los pacientes AR que al compararlos con los pacientes AA y C, mostraron diferencias estadísticamente significativas. Aunque en el resto de grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas, el siguiente grupo con niveles más altos fue el de pacientes con ANA seguido por el grupo de pacientes con AA y los niveles más bajos fueron para el grupo C. De hecho, los más altos, pero sin significación, fueron los niveles de IL-8 en los pacientes con ANA grave al compararlos con el resto de subgrupos de gravedad. Estos resultados van acorde con la idea de que el fenotipo ANA y, sus condiciones más graves, podrían deberse a un aumento de los neutrófilos que, a su vez, podría explicar los altos niveles de IL-8. Se observaron diferencias en el número de eosinófilos entre los grupos de gravedad (datos no mostrados), pero el número de neutrófilos no pudo ser analizado al no estar recogido en todos los pacientes. Por otro lado, la expresión proteica de IL-8 se correlacionó fuertemente con el porcentaje de eosinófilos en los pacientes con AA grave. La asociación de la expresión génica y proteica de IL-8 con los distintos fenotipos de inflamación Th2 (baja y alta) puede ser porque IL-8 se libera en muchas situaciones inflamatorias y por eso, no parece ser un marcador ideal para discriminarlos, aunque sí podría ser importante para discriminar gravedad.

A estos 3 últimos biomarcadores (PI3, CHI3L1 y IL-8) se les relaciona estrechamente con los neutrófilos, sugiriendo una importancia de estas células en la enfermedad asmática no alérgica y no eosinofílica y su gravedad (estos datos no se pueden demostrar aquí porque el número de neutrófilos no se determinó).

2. ANÁLISIS DE METILACIÓN

Para explicar las diferencias de expresión génica entre grupos, se analizó uno de los posibles mecanismos implicados en la regulación de estos genes, la metilación del ADN. Se realizó un estudio piloto con el análisis de la región promotora de 5 de los 9 genes seleccionados, que fueron *MSR1*, *PHLDA1*, *SERPINB2*, *CHI3L1* y *PI3*, y se analizaron las diferencias en el porcentaje de metilación entre sujetos C y pacientes con ANA grave. En estos genes previamente se había descrito su regulación epigenética relacionada con otras patologías. Yoshimura *et al.* (2004) propone a la metilación como un posible mecanismo causal del cambio de expresión de *MSR1* observado en el cáncer de pulmón primario. Además, un polimorfismo de *MSR1* se ha descrito como biomarcador para la detección del cáncer de próstata (Alvarez-Cubero *et al.*, 2015). La disminución de la expresión de *PHLDA1* se asocia con distintos tipos de cáncer y en concreto, en el cáncer de mama parece reprimirse mediante la regulación por un miRNA (Kastrati Canestri y Frascor, 2015). La regulación epigenética también se ha visto implicada en la

expresión de *SERPINB2* en enfermedades como el cáncer de mama (Pucci *et al.*, 2016) o la hipertensión pulmonar (Zhang *et al.*, 2015). La hipometilación de *CHI3L1* se asoció con la retinopatía diabética en pacientes que sufren diabetes tipo 1 (Agardh *et al.*, 2015) y con la artritis reumatoide (Nakano, Boyle y Firestein., 2013). Por último, se ha descrito una asociación significativa entre polimorfismos de *PI3* y el riesgo de padecer síndrome de estrés agudo respiratorio (Tejera *et al.*, 2014). En este trabajo, se decidió analizar la implicación de la metilación en la regulación de la expresión génica de la patología ANA grave.

Los resultados revelaron cómo todos los genes analizados, excepto *SERPINB2*, mostraron un perfil de metilación diferencial en los pacientes (Figura 9). En general había una hipermetilación de las islas CpG en los sujetos con ANA grave al compararlos con el grupo C. Además de esto, *MSR1* y *CHI3L1* mostraron correlación (positivas y negativas, respectivamente) entre la metilación de sus correspondientes islas CpG 4 y su expresión génica en los pacientes con asma grave. Todos estos datos sugieren que la metilación diferencial del ADN podría contribuir a la patogénesis de los pacientes con asma grave e indican que estos 4 biomarcadores podrían ser modulados por este mecanismo regulador. A pesar de la limitación del tamaño de la población y la necesidad de estudiar los otros fenotipos clínicos, pacientes con ANA moderada-leve, AA (grave y moderada-leve) y AR, estos resultados parecen apuntar a que este mecanismo epigenético podría estar implicado en la regulación de estos genes en la enfermedad asmática.

3. PANELES DE BIOMARCADORES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE FENOTIPOS CLÍNICOS DEL ASMA Y LA ALERGIA

Una vez estudiada su expresión génica y proteica, la sensibilidad y especificidad de la discriminación de los biomarcadores fue valorada para crear paneles que diferenciaron los distintos fenotipos clínicos y su gravedad. No siempre hay una asociación evidente entre un biomarcador individual y un fenotipo, lo que se traduce en la necesidad de utilizar paneles (Wadsworth, Sin y Dorscheid, 2011). El uso de paneles aumentaría la precisión para identificar endotipos (Canonica *et al.*, 2017). En esta Tesis se propone el uso de biomarcadores individuales y en el caso de que la discriminación no fuese óptima, el uso de *sets* de biomarcadores para caracterizar mejor al paciente. Las aproximaciones con parámetros únicos siguen siendo importantes en el proceso de descubrimiento de biomarcadores. Así, biomarcadores ya existentes e identificados por primera vez deberían ser integrados para reforzar el valor clínico de la estratificación de los fenotipos y endotipos asmáticos (Vijverberg *et al.*, 2013). El análisis de genes y proteínas permite descubrir las vías responsables y esto llevaría, con mayor probabilidad, a tratamientos que se puedan dirigir a la causa directa de estas enfermedades. En nuestro estudio,

se ha observado sobre todo a nivel proteico que, aunque algunos de los biomarcadores propuestos son mediocres individualmente, cuando combinamos sus expresiones, son capaces de discernir fenotipos clínicos y su gravedad con una sensibilidad y especificidad excelente. Estos análisis pretenden aportar distintos paneles de biomarcadores (individuales y combinados), asociados con las enfermedades asmáticas y alérgicas que podrían ser útiles para su diagnóstico y/o el tratamiento.

3.1. Paneles de biomarcadores génicos

En primer lugar, se analizó la expresión del ARN de los genes más relevantes en cada fenotipo clínico por el método de curvas ROC para comprobar la capacidad de estos genes como indicadores de la enfermedad. Primero se analizó su capacidad para diferenciar los pacientes de los sujetos sanos; después, se examinó su potencial como biomarcadores de la gravedad de enfermedad, comparando los pacientes con asma grave y moderada-leve de sujetos C; y por último, se estudió su potencial para discriminar los sujetos con diagnóstico grave de los sujetos con diagnóstico moderado-leve.

Como se resume en la Tabla 17, la mayoría de los genes fueron capaces de discriminar cualquiera de las condiciones fenotípicas (y su gravedad) del grupo C. En el caso del grupo con ANA (Tabla 17A), los valores AUC (entre 1 a 0,77) los clasificaron como test excelentes y buenos. Según nuestros resultados, *PI3* fue el mejor biomarcador génico (con valor AUC excelente) para diferenciar pacientes con ANA (o su gravedad) de sujetos C; para la comparación de pacientes con ANA moderada-leve también fue de categoría excelente el biomarcador de *CHI3L1*. El análisis por curvas ROC de la expresión génica del grupo con AA (Tabla 17B), mostró que la mayoría eran biomarcadores excelentes, muy buenos o buenos para discriminar este fenotipo, y su gravedad, del grupo C. Entre estos genes, encontramos con valores AUC excelentes a *CHI3L1*, *IL-1R2* y *PI3* para la comparación del grupo C *vs.* el grupo AA, al gen *PI3* para la de los grupos C *vs.* AA grave y, a los genes *CHI3L1*, *CPA3*, *IL-1R2*, *LYN*, *PI3* y *TAGAP* para la comparación de los grupos C *vs.* AA moderado-leve. La implicación de *CHI3L1* y *PI3* en la inflamación y en el asma ya se ha descrito en apartados anteriores (Apartado 1.6 y 1.7). *CPA3*, *IL-1R2* y *LYN* también tienen una asociación con el asma recogida en la literatura científica: *CPA3* se ha descrito como uno de los mejores discriminadores del asma eosinofílica en esputo (Baines *et al.*, 2014), la regulación de *IL-1R2* se vio asociada con el asma (Madore *et al.*, 2016) y *LYN* parece regular la secreción de moco en la inflamación de las vías respiratorias del asma alérgica (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque *TAGAP* se expresa en muchas células inmunes, alteraciones en este gen se han asociado con la inmunidad antiviral, la enfermedad de Crohn y la celiaquía, entre

otros procesos (Liao *et al.*, 2014) y hasta lo que llega nuestro conocimiento, el único trabajo que lo ha relacionado con mecanismos asmáticos y alérgicos es un trabajo previo de nuestro grupo (Aguerri, *et al.*, 2013). Por otro lado, cuando se realizó la comparación de los pacientes con ANA grave *vs.* ANA moderada-leve o AA grave *vs.* AA moderada-leve, los valores AUC fueron bajos clasificando a los genes como regulares o pobres. Para discriminar los pacientes con AR del grupo C hubo 11 genes con clasificación buena (valores AUC entre 0,87 y 0,77) (Tabla 17C).

Un segundo análisis de la expresión génica por el método de curvas ROC fue la diferenciación entre fenotipos clínicos (Tabla 18). Destacar aquí la importancia de esta discriminación que no se suele hacer en otros estudios y que en este trabajo se pudo realizar debido a los claros fenotipos clínicos que componen nuestra población de estudio. De nuevo en estas comparaciones entre fenotipos clínicos se observaron resultados de categoría excelente, muy buena y buena.

En general, estos análisis génicos refuerzan nuestros resultados publicados anteriormente (Baos *et al.*, 2017) y evidencian el potencial de los candidatos génicos seleccionados. La posibilidad de terapias dirigidas a genes para el asma en el futuro conlleva un gran atractivo, con el potencial teórico de tratar, curar o incluso prevenir el asma en individuos genéticamente susceptibles. Identificamos genes asociados con el asma y cuya sensibilidad y especificidad les convierte en potenciales predictores del diagnóstico del asma, sin necesidad de utilizar múltiples genes en combinación. Pero muchos autores describen cómo la genética no se puede considerar sola, y que son uno de tantos factores importantes dependientes del huésped y del medio ambiente (Russell y Brightling, 2017).

3.2. Paneles de biomarcadores proteicos

La definición de los diferentes endotipos y fenotipos implica la necesidad de encontrar biomarcadores no solo fiables, sino también de acceso fácil que guiarían al clínico a identificar la diana terapéutica de un único endotipo, y por lo tanto, de cada paciente (Canonica *et al.*, 2017). Este potencial lo cumplen nuestros resultados: obtenemos los biomarcadores del análisis de muestras derivadas de sangre como PBMC y suero, fáciles de recoger y que no ocasionan gran molestia a los pacientes. Aunque el uso de datos *ómicos* de plataformas múltiples (que incluyen la transcriptómica, la proteómica, la lipidómica o la metabolómica) en muestras de tejido pulmonar tiene mejor posibilidad de obtener endotipos claros (Anderson, 2008; Chung y Adcock, 2015), los biomarcadores necesitan ser desarrollados en muestras de acceso fácil, los llamados “biomarcadores de cabecera” (“*bedside biomarkers*”), que pueden ser analizados de forma relativamente fácil. De modo que, análisis que incluyan el aire exhalado, sangre u orina serían más

prometedores (Chung, 2017). Con nuestro estudio, intentamos satisfacer esa necesidad de desarrollar “biomarcadores de cabecera”.

Debido a esto, se determinó la efectividad de estos biomarcadores a nivel proteico. Basando este análisis de expresión proteica en las características ideales de un biomarcador (que sea específico, asequible, sensible, rápido y reproducible), se utilizaron dos técnicas, el ELISA y el *western blot*. La técnica ELISA es un ensayo cuantitativo basado en la unión específica entre un anticuerpo y su antígeno que se utiliza para analizar biomarcadores debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad (Kima *et al.*, 2014). Se ha utilizado la técnica del ELISA para estudiar las proteínas solubles que había disponibles comercialmente, es decir, IL-10, CHI3L1, IL-8, PI3 y POSTN. Los niveles de MSR1, PHLDA1 y SERPINB2 se estudiaron por *western blot*. CPA3 e IL-1R2 no se estudiaron a nivel proteico debido a, como se ha comentado previamente, no cumplía los criterios de restricción establecidos para esta selección ($RQ > 4$ o $RQ < 0,25$ en todas las comparaciones realizadas).

Se analizó el potencial de estos biomarcadores de forma individual y combinada, para valorar la existencia de efectos sinérgicos o de mejora de la discriminación, definida por un aumento del valor de AUC combinado respecto a los valores individuales. La Tabla 22 muestra el análisis global con la clasificación de los mejores biomarcadores individuales y combinados para cada comparación realizada. Además, se destacan los resultados con una mayor potencia estadística, definida como un valor de IC 95 % entre 0,70 y 1. En general, se obtuvieron muy buenos resultados AUC, y se proponen paneles de proteínas de biomarcadores individuales además de diferentes combinaciones de biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de pacientes que sufren ANA, AA y AR valorados en muestras de sangre periférica y a través de técnicas estándar. La elección de los mejores biomarcadores en cada discriminación se planteó en función del mejor valor de AUC cuantitativo (que permite objetivar los datos), analizado en el mayor número de casos y preferiblemente, realizado por la técnica más sencilla, el ELISA (aunque no se descarta la combinación de ELISA y *western blot*), que se realizaría con el suero de los pacientes como una prueba clínica de rutina.

Con todo esto, para discriminar el grupo con ANA del grupo C, se propone la combinación de la banda inferior y superior de MSR1, con un umbral de detección de 0,148 y 0,208 CR, respectivamente, que recalca lo observado a lo largo de este trabajo, es decir, la relevancia de este biomarcador en esta patología (Tabla 22A). Destacó la combinación de CHI3L1 con IL-8 y POSTN para discriminar los pacientes con diagnóstico ANA moderado-leve del grupo de pacientes con ANA grave (Tabla 22H), ya que es la combinación con el mejor valor AUC (0,98)

(umbrales: 18.500, 841 y 17.419 pg/ml, respectivamente). En otros estudios, se ha asociado la concentración de suero de YKL-40 con la gravedad del asma, correlacionándose inversamente con la función pulmonar y el FEV₁ (Chupp *et al.*, 2007), indicando que YKL-40 en suero era importante en el fenotipo inflamatorio del asma. Sin embargo, se ha descrito recientemente en un grupo grande de pacientes con asma, que las concentraciones en suero de YKL-40 solo se vieron incrementados sutilmente en aquellos con asma no alérgica más grave (Hansen *et al.*, 2015). Curiosamente, en contra a lo observado en estos estudios anteriores, los niveles proteicos de CHI3L1 en nuestros resultados fueron mayores en los pacientes con diagnóstico ANA moderado-leve al compararlos con los graves (Figura 11G). Esta combinación de 3 biomarcadores también recalca la importancia de IL-8 y confirman, de forma indirecta, la reciente publicación que describe que los neutrófilos e IL-8 son los únicos componentes inflamatorios del lavado broncoalveolar capaces de distinguir el asma controlada del asma no controlada (Hosoki *et al.*, 2015). CHI3L1, junto con los niveles de IL-8 y periostina, podrían ser medidos fácilmente y de forma reproducible por ELISA para verificar su capacidad predictiva para discernir entre la gravedad de pacientes con ANA.

Para discriminar el grupo con AA y el grupo C, destaca la combinación de CHI3L1 con SERPINB2 (Tabla 22D). Esta combinación es excelente por su valor AUC de 1 (umbrales: 20.065 pg/ml y 0,375 CR). Además, la combinación de CHI3L1 e IL-8 con categoría muy buena (AUC: 0,92) también podría ser interesante para esta discriminación, por la facilidad de la técnica de detección (ELISA con umbrales: 20.065 y 64 pg/ml). Para discernir entre la gravedad del grupo con AA, se propone la combinación de POSTN y SERPINB2 (AUC: 0,93 y umbrales: 19.119 pg/ml y 0,095 CR) (Tabla 22I). Aquí de nuevo, destaca POSTN y SERPINB2 para discriminar la inflamación eosinofílica, hecho ya descrito por autores como Jia *et al.* (2012) o Woodruff *et al.* (2009) que relacionaron estos biomarcadores con la respuesta inflamatoria Th2.

La combinación de CHI3L1 e IL-8 mostró importancia en la diferenciación del grupo con AR del C (Tabla 22G). Es la mejor de las opciones porque su valor AUC de 1 los clasifica como excelentes para discernir este fenotipo del sano y además, porque para la detección de ambos marcadores se utiliza la técnica de ELISA (umbrales CHI3L1: 9.953 pg/ml e IL-8: 627 pg/ml).

Por otro lado, se proponen en la Tabla 27 una serie de paneles para diferenciar los fenotipos clínicos entre sí, que se convierten en nuestra interesante y novedosa aportación a la búsqueda de herramientas de diagnóstico de las enfermedades asmáticas y alérgicas. La combinación de CHI3L1 con IL-10 y POSTN fue relevante para distinguir el grupo con ANA del grupo con AA y para diferenciar sus pacientes con diagnóstico moderado-leve, siendo los valores AUC y los

umbrales distintos: grupo con ANA *vs.* grupo con AA con valor AUC de 0,92 y umbrales de 20.202, 457,4 y 22.785 pg/ml, respectivamente; y pacientes con ANA moderada-leve *vs.* pacientes con AA moderada-leve con valor AUC de 0,90 y umbrales de 20.227, 167,9 y 24.658 pg/ml, respectivamente (Tabla 27A y B). Para discriminar fácilmente pacientes con ANA grave de AA grave se propone la combinación de CHI3L1 con IL-8 y POSTN (AUC: 0,96 y umbrales 20.202, 122 y 22.785 pg/ml (Tabla 27C).

Las combinaciones de CHI3L1 y SERPINB2 y la de CHI3L1 e IL-8 destacaron para la comparación entre el grupo con AA y el grupo con AR. La primera combinación destaca, por tener un AUC excelente (AUC: 1), aunque para su detección deberían utilizarse las técnicas de ELISA y *western blot*, y la segunda combinación, además de por el buen valor AUC (0,91), por ser fácilmente medible utilizando *kits* de ELISA (Tabla 27D).

La diferenciación de los pacientes con AA moderada-leve y AR podría realizarse midiendo los niveles de IL-8 (AUC: 0,96) en suero (Tabla 27E). Este biomarcador individual fue la mejor opción con el valor AUC más alto y de categoría muy buena. Los pacientes con AA grave podrían diferenciarse fácilmente midiendo los niveles de SERPINB2 (AUC: 1) por *western blot* o midiendo los de IL-8, PI3 y POSTN en combinación (AUC 0,98) por ELISA (Tabla 27F).

En resumen, se han obtenido resultados muy alentadores, pero aun así deberían ser analizados en estudios longitudinales, poblaciones mayores y por distintos grupos de investigación para así corroborar la validez y la reproducibilidad de dichos resultados. Esperamos que estos resultados sean un punto de partida para mejorar el diagnóstico y el tratamiento del asma y la alergia. La identificación de biomarcadores fiables es esencial para el desarrollo de métodos de tratamiento basados en la medicina de precisión (Desai *et al.*, 2016; Muraro *et al.*, 2016; Pavord *et al.*, 2018; Szeffler *et al.*, 2012; Agache *et al.*, 2015; Agache *et al.*, 2018). La heterogeneidad del asma y la encontrada en respuesta al tratamiento da lugar a una gestión insuficiente de la enfermedad en ciertos pacientes asmáticos, sobre todo los de diagnóstico grave. Mejoras en el manejo de la enfermedad requiere tratamientos individualizados y la clasificación de los pacientes basada en biomarcadores (Richards *et al.*, 2018). La habilidad para aplicar la medicina de precisión a los pacientes en la rutina del ámbito clínico depende de la disponibilidad de biomarcadores accesibles, facilitados por la tecnología, además del conocimiento para interpretar los resultados de estos para tomar decisiones clínicas y terapéuticas personalizadas (Canónica *et al.*, 2017). Aquí presentamos varias opciones de biomarcadores, seleccionados por su significación estadística con estrictos criterios para intentar compensar el tamaño de la muestra, y proporcionamos los umbrales para la discriminación de distintos fenotipos de asma y alergia, además de aportar

biomarcadores para la diferenciación de los pacientes con distinta gravedad de asma (intra e interfenotipos). Son pocos los trabajos que comparan específicamente grupos de pacientes con asma no alérgica y asma alérgica estudiando a la vez varios biomarcadores para crear paneles de discriminación (Hansen *et al.*, 2015, Madore *et al.*, 2016). Además, se ha intentado definir la implicación de la epigenética en la regulación de algunos de ellos.

Es común describir el asma en términos de características clínicas observables (fenotipos); sin embargo, mientras que las características observables son relevantes clínicamente, pueden no relacionarse con los mecanismos que conducen a la enfermedad (Hanania y Diamant, 2017). Por ello se pone cada vez mayor esfuerzo en la identificación y el entendimiento de estos conductores de la enfermedad (endotipos). La investigación del asma está cambiando de una perspectiva más amplia (expresión de síntomas, función pulmonar, respuesta a la medicación) hacia un foco más concreto como el estudio de perfiles celulares, análisis de proteínas y marcadores génicos que podrían combinarse con los parámetros clínicos (Holgate *et al.*, 2015; Lötvall *et al.*, 2011; Wagener *et al.*, 2013). Con los resultados obtenidos en esta Tesis intentamos contribuir a este cambio de perspectiva en el campo de la identificación de biomarcadores.

Con el aumento del número de biomarcadores nuevos y el conocimiento más detallado de perfiles de endotipos, pronto debería ser posible evaluar en profundidad un mecanismo individual de una enfermedad de un paciente y hacer a medida el tratamiento que más beneficio clínico le pueda aportar (Russell y Brightling, 2017). Hoy en día, el solapamiento de los diferentes grupos de endotipos y la variedad de efectos de la terapia aún son grandes, pero el progreso en la definición de la patogénesis del asma conseguirá aclarar esas diferencias borrosas. Esperamos que con nuestros resultados ayudemos a esta claridad, ya que aportamos biomarcadores nuevos a los pocos que hay en la actualidad asociados al fenotipo de asma no alérgica y su gravedad y, además, proponemos biomarcadores alternativos a los propuestos hoy en día en el ámbito clínico, en relación al fenotipo de asma alérgica. Esto es un punto crítico para el desarrollo de estrategias futuras de medicina de precisión en el asma y las enfermedades alérgicas, siendo esencial para así reducir el peso de estas enfermedades en la sanidad pública y, lo que es más importante, reducir el daño en los pacientes mejorando su calidad de vida. Hemos definido perfiles génicos y proteicos en muestras de PBMC y suero que podrían ser útiles para caracterizar los distintos fenotipos de asma y alergia, pero sobre todo, hemos descrito posibles biomarcadores nuevos de la gravedad de la enfermedad asmática, que como aportación novedosa consiguen discernir fenotipos clínicos entre sí.

CONCLUSIONES

Como conclusión general de esta Tesis Doctoral, se han definido paneles génicos y proteicos, compuestos por biomarcadores individuales y combinados, en muestras fáciles de obtener y por técnicas estandarizadas, que podrían ser útiles para caracterizar los distintos fenotipos de asma y alergia, pero sobre todo, para discernir distintos fenotipos clínicos entre sí, así como, la gravedad de la enfermedad asmática. Destacan además, los paneles diferenciales del fenotipo ANA por aportar nuevos biomarcadores para este tipo de asma, que dispone en la actualidad de muy pocas dianas para su diagnóstico y pronóstico.

De esta conclusión principal derivan las siguientes conclusiones parciales:

1. Setenta y cuatro de los 94 genes estudiados permiten discriminar los diferentes grupos clínicos analizados en base a su expresión génica. Aplicando criterios más estrictos se definieron en concreto:
 - 9 genes (*CHI3L1*, *CPA3*, *IL-1R2*, *IL-8*, *IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1*, *PI3* y *SERPINB2*) capaces de discriminar el grupo ANA y su gravedad del grupo C con alta sensibilidad y especificidad, aunque no fueron adecuados para comparar los subgrupos de gravedad de asma (ANA moderada-leve *vs.* ANA grave).
 - 35 genes capaces de discriminar el grupo AA y su gravedad del grupo C, de los que la mayoría se clasificaron como óptimos, aunque no lo fueron para discriminar los subgrupos de gravedad del asma.
 - 37 genes discriminatorios del grupo AR comparado con el grupo C, con capacidad discriminatoria buena en 11 de ellos.
 - 3 genes (*CPA3*, *IL-8* y *PI3*) capaces de discriminar los dos fenotipos con asma y su gravedad y 12 genes (destacando *CHI3L1*, *IL-8*, *IL-1R2*, *PI3* y *TAGAP*) para discriminar los dos fenotipos con alergia.
2. El análisis de expresión proteica de los genes estudiados revela diferencias estadísticamente significativas en los niveles de *CHI3L1*, *IL-8*, *MSR1*, *POSTN* y *SERPINB2* entre los grupos clínicos y la gravedad del asma. El análisis de las proteínas estudiadas en función a su alta sensibilidad y especificidad ha permitido definir paneles proteicos para discriminar los distintos fenotipos clínicos y su gravedad. En concreto, se destacan:
 - La combinación de la expresión proteica de las dos bandas de *MSR1* como excelente para diferenciar el grupo ANA del grupo C, y la combinación de tres proteínas (*CHI3L1*, *IL-8* y *POSTN*) para discernir los pacientes con ANA moderada-leve de los sujetos con ANA grave.

- Para la discriminación del grupo con AA del grupo C, la combinación de CHI3L1 con SERPINB2 y para discriminar a los pacientes con AA moderada-leve de los sujetos con AA grave, la combinación de POSTN y SERPINB2.
- La combinación de las expresiones proteicas de CHI3L1 e IL-8 en la diferenciación entre el grupo AR y el grupo C.
- Para la diferenciación de los fenotipos clínicos entre sí, las expresiones de CHI3L1 con IL-10 y POSTN para el grupo con ANA *vs.* el grupo con AA y los pacientes ANA moderados-leves *vs.* AA moderados-leves. CHI3L1 con IL-8 y POSTN destacan para diferenciar el grupo con ANA grave del grupo con AA grave. Para discriminar el grupo con AA del grupo con AR, se proponen la combinación de CHI3L1 y SERPINB2 como biomarcadores excelentes, y la de CHI3L1 e IL-8 como biomarcadores muy buenos.

Como conclusiones para los objetivos secundarios:

1. *CHI3L1*, *MSR1*, *PHLDA1* y *PI3* mostraron un patrón de metilación diferencial entre los pacientes con ANA grave y los sujetos C, apuntando a la implicación de este mecanismo en su regulación génica.
2. Se encontraron correlaciones interesantes entre los porcentajes de metilación, la expresión génica, los niveles proteicos y los parámetros clínicos y de funcionalidad.
3. Se ha demostrado la presencia de MSR1 (receptor clásicamente asociado a localizaciones tisulares) en todas las subpoblaciones celulares estudiadas en sangre y PBMC, observándose diferencias entre los grupos clínicos de estudio, con una mayor expresión total en los pacientes graves de EPOC y ANA, además de diferencias de expresión, esencialmente en los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos B. Todos estos resultados evidencian la importancia de este receptor, como nuevo biomarcador de diferentes patologías respiratorias.

BIBLIOGRAFÍA

- Agache, I., Strasser, D.S., Pierlot, G.M., Farine, H., Izuhara, K. y Akdis, C.A. (2018) “Monitoring inflammatory heterogeneity with multiple biomarkers for multidimensional endotyping of asthma”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), pp. 442-445.
- Agache, I., Sugita, K., Morita, H., Akdis, M. y Akdis, C.A. (2015) “The Complex Type 2 Endotype in Allergy and Asthma: From Laboratory to Bedside”, *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(6), p. 29.
- Agache, I.O. (2013) “From phenotypes to endotypes to asthma treatment”, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 13(3), pp. 249-56.
- Agardh, E., Lundstig, A., Perfilyev, A., Volkov, P., Freiburghaus, T., Lindholm, E., Rönn, T., Agardh, C.D. y Ling, C. (2015) “Genome-wide analysis of DNA methylation in subjects with type 1 diabetes identifies epigenetic modifications associated with proliferative diabetic retinopathy”, *BMC Medicine*, 13, p. 182.
- Aguerri M., Calzada D., Montaner D, Mata, M., Florido, F., Quiralte, J., Dopazo, J., Lahoz, C. y Cárdaa, B. (2013) “Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy”, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 27(2), pp. 337-350.
- Akdis, C.A. (2010) “Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance”, *Nature Medicine*, 18(5), pp. 736-749.
- Allen, T.C. y Kurdowska, A. (2014) “Interleukin 8 and acute lung injury”, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(2), pp. 266-269.
- Al-Muhsen, S., Johnson, J.R. y Hamid, Q. (2011) “Remodeling in asthma”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3), pp. 451-462.
- Alvarez-Cubero, M.J., Martinez-Gonzalez, L.J., Saiz, M., Carmona-Saez, P., Alvarez, J.C., Pascual-Geler, M., Lorente, J.A. y Cozar, J.M. (2015) “Prognostic role of genetic biomarkers in clinical progression of prostate cancer”, *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 47, p. e176. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/emm.2015.43> [Consulta: 17 de abril 2018].
- American Thoracic Society y European Respiratory Society. (2005) “ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(8), pp. 912-930.
- Anderson, G.P. (2008) “Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease”, *Lancet*, 372(9643), pp. 1107-1119.
- Arbes, S.J. Jr., Gergen, P.J., Vaughn, B. y Zeldin, D.C. (2007) “Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(5), pp. 1139-1145.

- Arron, J.R., Scheerens, H. y Matthews, J.G. (2013) "Redefining approaches to asthma: developing targeted biologic therapies", *Advances in Pharmacology*, 66, pp. 1-49.
- Baines, K.J., Simpson, J.L., Wood, L.G., Scott, R.J., Fibbens, N.L., Powell, H., Cowan, D.C., Taylor, D.R., Cowan, J.O. y Gibson, P.G. (2014) "Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(4), pp. 997-1007.
- Baines, K.J., Simpson, J.L., Bowden, N.A., Scott, R.J. y Gibson, P.G. (2010) "Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes", *The European Respiratory Journal*, 35(3), pp. 522-523.
- Baos, S., Calzada, D., Cremades, L., Sastre, J., Quiralte, J., Florido, F., Florido, F., Lahoz, C. y Cárdbaba, B. (2017) "Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma", *Molecular Immunology*, 82, pp. 34-45.
- Barker, D.J., Godfrey, K.M., Fall, C., Osmond, C., Winter, P.D. y Shaheen, S.O. (1991) "Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease", *The BMJ*, 303(6804), pp. 671-675.
- Barnes P.J. (2017). "Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD", *Clinical Science (London)*, 131(13), pp. 1541-1558.
- Barnes, P.J. (2008) "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease", *Nature Reviews Immunology*, 8(3), pp. 183-192.
- Barnes, P.J. (2011) "Pathophysiology of allergic inflammation", *Immunological Reviews*, 242(1), pp. 31-50.
- Barnes, P.J. (2014) "Cellular and molecular mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease", *Clinics in Chest Medicine*, 35(1), pp. 71-86.
- Barnes, P.J. (2016) "Inflammatory mechanisms in COPD", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), pp. 16-27.
- Bateman, E.D., Jacques, L., Goldfrad, C., Atienza, T., Mihaescu, T. y Duggan, M. (2006) "Asthma control can be maintained when fluticasone propionate/salmeterol in a single inhaler is stepped down", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(3), pp. 563-570.
- Baye, T.M., Martín, L.J. y Khurana Hershey, G.K. (2010) "Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), pp. 425-436.
- Been, J.V., Lugtenberg, M.J., Smets, E., van Schayck, C.P., Kramer, B.W., Mommers, M. y Sheikh, A. (2014) "Preterm birth and childhood wheezing disorders: a systematic review and

- metaanalysis”, *PLoS Medicine*, vol. 11(1), p. e1001596. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001596> [Consulta: 1 de marzo 2018].
- Bel, E.H. (2004) “Clinical Phenotypes of Asthma”, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 10(1), pp. 44-50.
 - Benjamini Y. y Hochberg Y. (1995) “Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing”, *Journal of the Royal Statistical Society*, 57(1), pp. 289-300.
 - Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhata, R. y Shilatifard, A. (2009) “An operational definition of epigenetics”, *Genes & Development*, 23(7), pp. 781-783.
 - Berry, A. y Busse, W.W. (2016) “Biomarkers in asthmatic patients: Has their time come to direct treatment?”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(5), pp. 1317-1324.
 - Bérubé, J.C. y Bossé, Y. (2014) “Future clinical implications emerging from recent genome-wide expression studies in asthma”, *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(8), pp. 985-1004.
 - Bhakta, N.R. y Woodruff, P.G. (2011) “Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again”, *Immunological Reviews*. 242(1), pp. 220-232.
 - Bianchetti, L., Barczyk, M., Cardoso, J., Schmidt, M., Bellini, A. y Mattoli, S. (2012) “Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), pp. 483-495.
 - Biomarkers Definitions Working Group. (2001) “Biomarkers and surrogate end points: Preferred definitions and conceptual framework”, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), pp. 89-95.
 - Blumenthal, M. (2012) “Genetic, epigenetic, and environmental factors in asthma and allergy”, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 108(2), pp. 69-73.
 - Bobolea, I., Barranco, P., Del Pozo, V., Romero, D., Sanz, V., López-Carrasco, V., Canabal, J., Villasante, C. y Quirce, S. (2015) “Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes”, *Allergy*, 70(5), pp. 540-546.
 - Boezen, H.M., Schouten, J.P., Postma, D.S. y Rijcken, B. (1994) “Distribution of peak expiratory flow variability by age, gender and smoking habits in a random population sample aged 20-70 yrs”, *European Respiratory Journal*, 7(10), pp. 1814-1820.
 - Boyman, O., Kaegi, C., Akdis, M., Bavbek, S., Bossios, A., Chatzipetrou, A., Eiwegger, T., Firinu, D., Harr, T., Knol, E., Matucci, A., Palomares, O., Schmidt-Weber, C., Simon, H.U., Steiner, U.C., Vultaggio, A., Akdis, C.A. y Spertini, F. (2015) “EAACI IG Biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders”, *Allergy*, 70(7), pp. 727-754.

- Braido, F., Holgate, S. y Canonica, G.W. (2012) “From “blockbusters” to “biosimilars”: an opportunity for patients, medical specialists and healthcare providers”, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 25(6), pp. 483-486.
- British Thoracic Society y Scottish Intercollegiate Guidelines Network (2012): *British guideline on the management of asthma. A national clinic guideline*. Disponible en: <https://www.brit-thoracic.org.uk/document-library/clinical-information/asthma/btssign-asthma-guideline-2012/> [Consulta: 14 de Febrero 2018].
- Brown, A., Farmer, K., MacDonald, L., Kalsheker, N., Pritchard, D., Haslett, C., Lamb, J. y Sallenave, J.M. (2003) “House dust mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors”, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(3), pp. 381-389.
- Brusselle, G.G., Joos, G.F. y Bracke, K.R. (2011) “New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease”, *Lancet*, 378(9795), pp. 1015–1026.
- Buist, A.S., McBurnie, M.A., Vollmer, W.M., Gillespie, S., Burney, P., Mannino, D.M., Menezes, A.M., Sullivan, S.D., Lee, T.A., Weiss, K.B., Jensen, R.L., Marks, G.B., Gulsvik, A. y Nizankowska-Mogilnicka, E.; BOLD Collaborative Research Group. (2007) “International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study”, *Lancet*, 370(9589), pp. 741-750.
- Buke, W., Fesinmeyer, M., Reed, K., Hampson, L. y Caristen, C. (2003) “Family history as a predictor of asthma risk”, *American Journal of Preventive Medicine*, 24(2), pp. 160-169.
- Bullens, D.M., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P.W., Dupont, L.J. y Ceuppens, J.L. (2006) “IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?”, *Respiratory Research*, 7, p. 135.
- Burgel, P.R., Paillasseur, J.L., Caillaud, D., Tillie-Leblond, I., Chanez, P., Escamilla, R. Court-Fortune, I., Perez, T., Carré, P. y Roche, N.; Initiatives BPCO Scientific Committee. (2010) “Clinical COPD phenotypes: a novel approach using principal component and cluster analyses”, *European Respiratory Journal*, 36(3), pp. 531-539.
- Burgess, J.A., Walters, E.H., Byrnes, G.B., Matheson, M.C., Jenkins, M.A., Wharton, C.L., Johns, D.P., Abramson, M.J., Hopper, J.L. y Dharmage, S.C. (2007) “Childhood allergic rhinitis predicts asthma incidence and persistence to middle age: a longitudinal study”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(4), pp. 863-869.
- Busse, W.W., Holgate, S., Kerwin, E., Chon, Y., Feng, J., Lin, J. y Lin, S.L. (2013) “Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17

- receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(11), pp. 1294-1302.
- Byrne, A.L., Marais, B.J., Mitnick, C.D., Lecca, L. y Marks, G.B. (2015) “Tuberculosis and chronic respiratory disease: a systematic review”, *International Journal of Infectious Diseases*, 32, pp. 138-146.
 - Canonica, G.W., Ferrando, M., Baiardini, I., Puggioni, F., Racca, F., Passalacqua, G. y Heffler, E. (2018) “Asthma: personalized and precision medicine”, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 18(1), pp. 51-58.
 - Cárdena, B. (2015) “Aspectos genéticos, ambientales y epigenéticos de las enfermedades alérgicas”. En: Dávila González, I.J., Jauregui Presa, I., Olaguibel Rivera, J.M. y Zubeldía Ortuño, J.M.. (Eds) *Tratado de Alergología*. 2^{da} Edición. Madrid: ergon, pp. 81-100.
 - Carlson, C.S., Eberle, M.A., Kruglyak, L. y Nickerson, D.A. (2004) “Mapping complex disease loci in whole-genome association studies”, *Nature*, 429(6990), pp. 446-452.
 - Carlson, M., Håkansson, L., Kämpe, M., Stålenheim, G., Peterson, C. y Venge, P. (1992) “Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 89(1 Pt 1), pp. 131-139.
 - Carrasco, E. (2013) “Avances en la terapia inhalatoria de las vías aéreas en asma y EPOC”, *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 29, pp. 204-215.
 - Castaldi, P.J., Dy, J., Ross, J., Chang, Y., Washko, G.R., Curran-Everett, Williams, A., Lynch, D.A., Make, B.J., Crapo, J.D., Bowler, R.P., Regan, E.A., Hokanson, J.E., Kinney, G.L., Han, M.K., Soler, X., Ramsdell, J.W., Barr, R.G., Foreman, M., van Beek, E., Casaburi, R., Criner, G.J., Lutz, S.M., Rennard, S.I., Santorico, S., Sciurba, F.C., DeMeo, D.L., Hersh, C.P., Silverman, E.K. y Cho, M.H. (2014) “Cluster analysis in the COPD Gene study identifies subtypes of smokers with distinct patterns of airway disease and emphysema”, *Thorax*, 69(5), pp. 415-422.
 - Chambers, E.S., Nanzer, A.M., Pfeffer, P.E., Richards, D.F., Timms, P.M., Martineau, A.R., Griffiths, C.J., Corrigan, C.J. y Hawrylowicz, C.M. (2015) “Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A^{high} and IFN- γ ^{high} immunophenotypes: potential benefits of calcitriol”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3), pp. 628-637.
 - Chesné, J., Braza, F., Mahay, G., Brouard, S., Aronica, M. y Magnan, A. (2014) “IL-17 in severe asthma. Where do we stand?”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(10), pp. 1094-1101.
 - Chung, K.F. (2013) “New treatments for severe treatment-resistant asthma: targeting the right patient”, *The Lancet Respiratory Medicine*, 1(8), pp. 639-652.

- Chung, K.F. (2018). "Precision medicine in asthma: linking phenotypes to targeted treatments", *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 24(1), pp. 4-10.
- Chung, K.F. y Adcock, I.M. (2015) "Clinical phenotypes of asthma should link up with disease mechanisms", *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(1), pp. 56-62.
- Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, J., Adcock, I.M., Bateman, E.D., Bel, E.H., Bleecker, E.R., Boulet, L.P., Brightling, C., Chanez, P., Dahlen, S.E., Djukanovic, R., Frey, U., Gaga, M., Gibson, P., Hamid, Q., Jajour, N.N., Mauad, T., Sorkness, R.L. y Teague, W.G. (2014) "International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma", *European Respiratory Journal*, 43(2), pp. 343-373.
- Chupp, G.L., Lee, C.G., Jarjour, N., Shim, Y.M., Holm, C.T., He, S., Dziura, J.D., Reed, J., Coyle, A.J., Kiener, P., Cullen, M., Grandsaigne, M., Dombret, M.C., Aubier, M., Pretolani, M. y Elias, J.A. (2007) "A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma", *The New England Journal of Medicine*, 357(20), pp. 2016-2027.
- Cockcroft, D.W. (2003) "Bronchoprovocation methods: direct challenges", *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 24(1), pp. 19-26.
- Cockcroft, D.W. y Swystun, V.A. (1996) "Asthma control versus asthma severity", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98(6 Pt 1), pp. 1016-1018.
- Collins, F.S. y Varmus, H. (2015) "A new initiative on precision medicine", *The New England Journal of Medicine*, 372(9), pp. 793-795.
- Comité Ejecutivo de la Guía Española para el Manejo del Asma (2017): *GEMA^{4.2} Guía española para el manejo del asma*. Disponible en: <http://www.gemasma.com> [Consulta: 16 de febrero 2018].
- Comité Ejecutivo de la Guía Española para el Manejo del Asma. (2015): *GEMA^{4.0}. Guía española para el manejo del asma*. Disponible en <http://www.gemasma.com> [Consulta 16 febrero 2018].
- Coolen, M.W., Statham, A.L., Gardiner-Garden, M. y Clark, S.J. (2007) "Genomic profiling of CpG methylation and allelic specificity using quantitative high-throughput mass spectrometry: critical evaluation and improvements", *Nucleic Acids Research*, vol. 35(18), p. e119. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm662> [Consulta: 20 de enero 2018].
- Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M.D., Bohen, S.P. y Matthews, J.G. (2011) "Lebrikizumab treatment in adults with asthma", *The New England Journal of Medicine*, 365, pp. 1088-1098.

- Cowan, D.C., Cowan, J.O., Palmay, R., Williamson, A. y Taylor, D.R. (2010) "Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma", *Thorax*, 65(5), pp. 384-390.
- D'Amato, G., Stanziola, A., Sanduzzi, A., Liccardi, G., Salzillo, A., Vitale, C., Molino, A., Vatrella, A. y D'Amato, M. (2014) "Treating severe allergic asthma with anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab): a review", *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 9(1), p. 23.
- de Marco, R., Accordini, S., Marcon, A., Cerveri, I., Antó, J.M., Gislason, T., Heinrich, J., Janson, C., Jarvis, D., Kuenzli, N., Leynaert, B., Sunyer, J., Svanes, C., Wjst, M. y Burney, P.; European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). (2011) "Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183, pp. 891-897.
- Desai, M. y Oppenheimer, J. (2016) "Elucidating asthma phenotypes and endotypes: progress towards personalized medicine", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 116(5), pp. 394-401.
- DeVries, A. y Vercelli, D. (2013) "Epigenetics of human asthma and allergy: promises to keep", *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 31(3), pp. 183-189.
- Diamant, Z., Boot, J.D., Mantzouranis, E., Flohr, R., Sterk, P.J. y Gerth van Wijk, R. (2010) "Biomarkers in asthma and allergic rhinitis", *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 23(6), pp. 468-481.
- Dweik, R., Boggs, P., Erzurum, S., Irvin, C.J., Leigh, M.W., Lundberg, J.O., Olin, A.C., Plummer, A.L. y Taylor, D.R.; American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. (2011) "An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(5), pp. 602-615.
- Ehrich, M., Nelson, M.R., Stanssens, P., Zabeau, M., Liloglou, T., Xinarianos, G., Cantor, C.R., Field, J.K. y van den Boom, D. (2005) "Quantitative high-throughput analysis of ADN methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), pp. 15785-15790.
- Eisner, M.D., Anthonisen, N., Coultas, D., Kuenzli, N., Perez-Padilla, R., Postma, D., Romieu, I., Silverman, E.K., Balmes, J.R.; Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly. (2010) "An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(5), pp. 693-718.
- Ezzati, M. (2005) "Indoor air pollution and health in developing countries", *Lancet*, 366(9480), pp. 104-106.

- Fajt, M.L. y Wenzel, S.E. (2015) “Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(2), pp. 300-310.
- Fernández, P. S. y Díaz, S.P. (2003): *Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad*. Disponible en: https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp [Consulta: 20 de febrero 2016].
- Gan, W.Q., FitzGerald, J.M., Carlsten, C., Sadatsafavi, M. y Brauer, M. (2013) “Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(7), pp. 721-727.
- Gao, J., Garulacan, L.A., Storm, S.M., Opitck, G.J., Dubaquié, Y., Hefta, S.A., Dambach, D.M. y Dongre, A.R. (2005) “Biomarker discovery in biological fluids”, *Methods*, 35(3), pp. 291-302.
- George, B.J., Reif, D.M., Gallagher, J.E., Williams-DeVane, C.R., Heidenfelder, B.L., Hudgens, E.E., Jones, W., Neas, L., Hubal, E.A.C. y Edwards, S.W. (2015) “Data-Driven Asthma Endotypes Defined from Blood Biomarker and Gene Expression Data”, *PLoS ONE*, vol. 10(2), p. e0117445. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117445> [Consulta: 15 de Marzo 2018].
- Givi, M.E., Redegeld, F.A., Folkerts, G. y Mortaz, E. (2012) “Dendritic cells in pathogenesis of COPD”, *Current Pharmaceutical Design*, 18(16), pp. 2329-2335.
- Global Initiative for Asthma (2018): *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Disponible en: <http://www.ginasthma.com> [Consulta: 20 de abril 2018].
- Grainge, C.L., Lau, L.C., Ward, J.A., Dulay, V., Lahiff, G., Wilson, S., Holgate, S., Davies, D.E. y Howarth, P.H. (2011) “Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma”, *The New England Journal of Medicine*, 364(21), pp. 2006-2015.
- Green, R.H., Brightling, C.E., Woltmann, G., Parker, D., Wardlaw, A.J. y Pavord, I.D. (2002) “Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids”, *Thorax*, 57(10), pp. 875-879.
- Hakonarson, H., Bjornsdottir, U.S. y Halapi, E. (2005) “Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp. 14789-14794.
- Hanania, N.A. y Diamant, Z. (2018) “The road to precision medicine in asthma: challenges and opportunities”, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 24(1), pp. 1-3.

- Hansel, N.N., Cheadle, C., Diette, G.B., Wright, J., Thompson, K.M., Barnes, K.C. y Georas, S.N. (2008) “Analysis of CD4+ T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms”, *Allergy*, 63(8), pp. 366-369.
- Hansen, J.W., Thomsen, S.F., Porsbjerg, C., Rasmussen, L.M., Harmsen, L., Johansen, J.S. y Backer, V. (2015) “YKL-40 and genetic status of CHI3L1 in a large group of asthmatics”, *European Clinical Respiratory Journal*, vol. 2, p. 25117. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.3402/ecrj.v2.25117> [Consulta: 17 de abril 2018].
- Heinzerling, L., Mari, A., Bergmann, K.C., Bresciani, M., Burbach, G., Darsow, U., Durham, S., Fokkens, W., Gjomarkaj, M., Haahtela, T., Bom, A.T., Wöhr, S., Maibach, H. y Lockett, R. (2013) “The skin prick test - European standards”, *Clinical and Translational Allergy*, 3(1), p. 3.
- Hersey, G.K.K. (2004) “Is it all in our genes? The “mite-y” truth”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(3), pp. 392-394.
- Hinks, T.S., Brown, T., Lau, L.C., Rupani, H., Barber, C., Elliott, S., Ward, J.A., Ono, J., Ohta, S., Izuhara, K., Djukanović, R., Kurukulaarachy, R.J., Chauhan, A. y Howarth, P.H. (2016) “Multidimensional endotyping in patients with severe asthma reveals inflammatory heterogeneity in matrix metalloproteinases and chitinase 3-like protein 1”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), pp. 61-75.
- Hogg, J.C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciurba, F.C., Coxson, H.O. y Paré, P.D. (2004) “The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease”, *The New England Journal of Medicine*, 350(26), pp. 2645-2653.
- Holgate, S.T. (2012) “Stratified approaches to the treatment of asthma”, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 76(2), pp. 277-291.
- Holgate, S.T., Wenzel, S., Postma, D.S., Weiss, S.T., Renz, H. y Sly, P.D. (2015) “Asthma”, *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1, p. 15025. Disponible en: <https://doi:10.1038/nrdp.2015.25> [Consulta: 17 de abril 2018].
- Holleman D.R. Jr. y Simel D.L. (1995) “Does the clinical examination predict airflow limitation?”, *JAMA*, 274(4), pp. 313-319.
- Holloway, J.W., Yang, I.A. y Holgate, S.T. (2010) “Genetics of allergic disease”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Supl 2), pp. S81-94.
- Hosoki, K., Ying, S., Corrigan, C., Qi, H., Kurosky, A., Jennings, K., Sun, Q., Boldogh, I. y Sur, S1. (2015) “Analysis of a Panel of 48 Cytokines in BAL Fluids Specifically Identifies IL-8 Levels as the Only Cytokine that Distinguishes Controlled Asthma from Uncontrolled

- Asthma, and Correlates Inversely with FEV₁”, *PLoS One*, vol. 10(5), p. e0126035. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126035> [Consulta: 20 de marzo 2018].
- Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Bergmann, R., Niggemann, B., Sommerfeld, C. y Wahn, U.; MAS Group. (2001) “Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study”, *The BMJ*, 322(7283), pp. 390-395.
 - Izuhara, K., y Saito, H. (2006) “Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma”, *Allergy International*, 55(4), pp. 361-367.
 - Jackson, D.J. y Johnston, S.L. (2010) “The role of viruses in acute exacerbations of asthma”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), pp. 1178-1187.
 - Jia, G., Erickson, R.W., Choy, D.F., Mosesova, S., Wu, L.C., Solberg, O.D., Shikotra, A., Carter, R., Audusseau, S., Hamid, Q., Bradding, P., Fahy, J.V., Woodruff, P.G., Harris, J.M. y Arron, J.R.; Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) Study Group. (2012) “Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), pp. 647-654.
 - Jia, G., Erickson, R.W., Choy, D.F., Mosesova, S., Wu, L.C., Solberg, O.D., Shikotra, A., Carter, R., Audusseau, S., Hamid, Q., Bradding, P., Fahy, J.V., Woodruff, P.G., Harris, J.M. y Arron, J.R.; Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) Study Group. (2012) “Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), pp. 647-654.
 - Jordan, T.S., Spencer, E.M. y Davies, P. (2010) “Tuberculosis, bronchiectasis and chronic airflow obstruction”, *Respirology*, 15(4), pp. 623-628.
 - Kaku, Y., Imaoka, H., Morimatsu, Y., Komohara, Y., Ohnishi, K., Oda, H., Takenaka, S., Matsuoka, M., Kawayama, T., Takeya, M. y Hoshino, T. (2014) “Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on Alveolar Macrophages in the Lungs of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *PLoS ONE*, vol. 9(1), p. e87400. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087400> [Consulta: 17 de abril 2018].
 - Karrasch, S., Linde, K., Rücker, G., Sommer, H., Karsch-Völck, M., Kleijnen, J., Jörres, R.A. y Schneider, A. (2017) “Accuracy of FE_{NO} for diagnosing asthma: a systematic review”, *Thorax*, 72(2), pp. 109-116.
 - Kastrati, I., Canestrari, E. y Frasor, J. (2015) “PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NF κ B-miR-181 regulatory loop and is essential for formation of ER+ mammospheres”, *Oncogene*, 34(18), pp. 2309-2316.

- Kelley, J.L., Ozment, T.R., Li, C., Schweitzer, J.B. y Williams, D.L. (2014) "Scavenger Receptor-A (CD204): A Two-Edged Sword in Health and Disease", *Critical Reviews in Immunology*, 34(3), pp. 241-261
- Kerkhof, M., Wijga, A.H., Brunekreef, B., Smit, H.A., de Jongste, J.C., Aalberse, R.C., Hoekstra, M.O., Gerritsen, J. y Postma, D.S. (2009) "Effects of pets on asthma development up to 8 years of age: the PIAMA study", *Allergy*, 64(8), pp. 1202-1208.
- Kima, M.A., Shina, Y.S., Phama, L.D. y Parka, H.S. (2014) "Adult asthma biomarkers", *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(1), pp. 49-54.
- King, T.P., Norman, P.S. y Conell, J.T. (1964) "Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen II", *Biochemistry*, 3, pp. 458-468.
- Kitch, B.T., Paltiel, A.D., Kuntz, K.M., Dockery, D.W., Schouten, J.P., Weiss, S.T. y Fuhlbrigge A.L. (2004) "A single measure of FEV₁ is associated with risk of asthma attacks in long-term follow-up", *Chest*, 126(6), pp. 1875-1882.
- Kohansal, R., Martinez-Camblor, P., Agusti, A., Buist, A.S., Mannino, D.M. y Soriano, J.B. (2009) "The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(1), pp. 3-10.
- Konradsen, J.R., James, A., Nordlund, B., Reinius, L.E., Söderhäll, C., Melén, E., Wheelock, A.M., Lödrup Carlsen, K.C., Lidegran, M., Verhoek, M., Boot, R.G., Dahlén, B., Dahlén, S.E. y Hedlin, G. (2013) "The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(2), pp. 328-335.
- Korevaar, D.A., Westerhof, G.A., Wang, J., Cohen, J.F., Spijker, R., Sterk, P.J., Bel, E.H. y Bossuyt, P.M. (2015) "Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis", *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(4), pp. 290-300.
- Kucuksezer, U.C., Ozdemir, C., Akdis, M. y Akdis, C.A. (2013) "Mechanisms of immune tolerance to allergens in children", *Korean Journal of Pediatrics*, 56(12), pp. 505-513.
- Kuperman, D.A., Lewis, C.C., Woodruff, P.G., Rodriguez, M.W., Yang, Y.H., Dolganov, G.M., Fahy, J.V. y Erle, D.J. (2005) "Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2), pp. 305-311.
- Lamprecht, B., McBurnie, M.A., Vollmer, W.M., Gudmundsson, G., Welte, T., Nizankowska-Mogilnicka, E., Studnicka, M., Bateman, E., Anto, J.M., Burney, P., Mannino, D.M. y Buist,

- S.A.; BOLD Collaborative Research Group. (2011) "COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study", *Chest*, 139(4), pp. 752-763.
- Larché, M., Akdis, C. A. y Valenta, R. (2006) "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy", *Nature Reviews Immunology*, 6(10), pp. 761-771.
 - Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.J., He, C.H., Takyar, S. y Elias, J.A. (2011) "Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury", *Annual Review of Physiology*, 73, pp. 479-501.
 - Levine, S.J. y Wenzel, S.E. (2010) "Narrative review: the role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes", *Annals of Internal Medicine*, 152(4), pp. 232-237.
 - Liao, J., Jijon, H.B., Kim, I.R., Goel, G., Doan, A., Sokol, H., Bauer, H., Herrmann, B.G., Lassen, K.G. y Xavier, R.J. (2014) "An image-based genetic assay identifies genes in T1D susceptibility loci controlling cellular antiviral immunity in mouse", *PLoS One*, vol. 9(9), p. e108777. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108777>. eCollection 2014 [Consulta: 1 de junio 2018].
 - Licona-Limon, P., Kim, L.K., Palm, N.W. y Flavell, R.A. (2013) "TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells", *Nature Immunology*, 14(6), pp. 536-542.
 - Lim, H.F. y Nair, P. (2018) "Airway inflammation and inflammatory biomarkers", *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 39(1), pp. 56-63.
 - Lindén, A. y Dahlén, B. (2014) "Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma", *European Respiratory Journal*, 44(5), pp. 1319-1331.
 - Lo, C.Y., Michaeloudes, C., Bhavsar, P.K., Huang, C.D., Wang, C.H., Kuo, H.P. y Chung, K.F. (2015) "Increased phenotypic differentiation and reduced corticosteroid sensitivity of fibrocytes in severe asthma", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), pp. 1186-1195.
 - Lötvall, J., Akdis, C.A., Bacharier, L.B., Bjermer, L., Casale, T.B., Custovic, A., Lemanske, R.F. Jr., Wardlaw, A.J., Wenzel, S.E. y Greenberger, P.A. (2011) "Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), pp. 355-360.
 - Lowenstein, H. (1985) "Molecular characteristics of allergens", *Allergy*, 40 (3), pp. 10-12.
 - Madore, A.M., Vaillancourt, V.T., Bouzigon, E., Sarnowski, C., Monier, F., Dizier, M.H., Demenais, F. y Laprise, C. (2016) "Genes Involved in Interleukin-1 Receptor Type II Activities Are Associated With Asthmatic Phenotypes", *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 8(5), pp. 466-470.

- Marra, F., Lynd, L., Coombes, M., Richardson, K., Legal, M., Fitzgerald, J.M. y Marra, C.A. (2006) "Does antibiotic exposure during infancy lead to development of asthma?: a systematic review and metaanalysis", *Chest*, 129(3), pp. 610-618.
- Martínez-Moragón, E., Serra-Batlles, J., de Diego, A., Palop, M., Casan, P., Rubio-Terrés, C. y Pellicer, C.; por el grupo de Investigadores del estudio AsmaCost. (2009) "Economic cost of treating the patient with asthma in Spain: the AsmaCost study", *Archivos de Bronconeumología*, 45(10), pp. 481-486.
- McKeage, K. (2013) "Omalizumab: a review of its use in patients with severe persistent allergic asthma", *Drugs*, 73(11), pp. 1197-1212.
- Medical Research Council Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis. (1965) "Definition and classification of chronic bronchitis for clinical and epidemiological purposes. A report to the Medical Research Council by their Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis", *Lancet*, 1(7389), pp. 775-779.
- Medrek, S.K., Parulekar, A.D. y Hanania, N.A. (2017) "Predictive biomarkers for asthma therapy", *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(10), p. 69.
- Menezes, A.M., Hallal, P.C., Perez-Padilla, R., Jardim, J.R., Muiño, A., Lopez, M.V., Valdivia, G., Montes de Oca, M., Talamo, C., Pertuze, J. y Victora, C.G.; Latin American Project for the Investigation of Obstructive Lung Disease (PLATINO) Team. (2007) "Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America", *European Respiratory Journal*, 30(6), pp. 1180-1185.
- Mingomataj E.C. y Bakiri, A.H. (2016) "Regulator versus effector paradigm: interleukin-10 as indicator of the switching response", *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 50, pp. 97-113.
- Miravittles, M., Worth, H., Soler Cataluna, J.J., Price, D., De Benedetto, F., Roche, N., Godtfredsen, N.S., van der Molen, T., Löfdahl, C.G., Padullés, L. y Ribera, A. (2014) "Observational study to characterize 24-hour COPD symptoms and their relationship with patient-reported outcomes: results from the ASSESS study", *Respiratory Research*, 15, p. 122.
- Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li, H., Busse, W.W., Jarjour, N.N., Wenzel, S.E., Peters, S.P., Meyers, D.A. y Bleecker, E.R.; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. (2014) "Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(6), pp. 1557-1563.e5.
- Moore, W.C., Meyers, D.A., Wenzel, S.E., Teague, W.G., Li, H., Li, X., D'Agostino, R. Jr., Castro, M., Curran-Everett, D., Fitzpatrick, A.M., Gaston, B., Jarjour, N.N., Sorkness, R., Calhoun, W.J., Chung, K.F., Comhair, S.A., Dweik, R.A., Israel, E., Peters, S.P., Busse, W.W.,

- Erzurum, S.C. y Bleecker, E.R.; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. (2010) "Identification of asthma phenotypes using a clustering analysis in the Severe Asthma Research Program", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(4), pp. 315-323.
- Mukherjee, M., Svenningsen, S. y Nair, P. (2017) "Glucocorticosteroid subsensitivity and asthma severity", *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23(1), pp. 78-88.
 - Muraro, A., Lemanske, R.F., Hellings, P.W., Akdis, C.A., Bieber, T., Casale, T.B., Jutel, M., Ong, P.Y., Poulsen, L.K., Schmid-Grendelmeier, P., Simon, H.U., Seys, S.F. y Agache, I. (2016) "Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(5), pp. 1347-1358.
 - Nadif, R., Siroux, V., Boudier, A., le Moual, N., Just, J., Gormand, F., Pison, C., Matran, R. y Pin, I. (2016) "Blood granulocyte patterns as predictors of asthma phenotypes in adults from the EGEA study", *European Respiratory Journal*, 48(4), pp. 1040-1051.
 - Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi T. y Takahashi, K. (1991) "Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine macrophage scavenger receptors", *The American Journal of Pathology*, 139(6), pp. 1411-1423.
 - Nakano, K., Boyle, D.L. y Firestein, G.S. (2013). "Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes", *Journal of Immunology*, 190(3), pp. 1297-1303.
 - Nakayama, M., Kudoh, T., Kaikita, K., Yoshimura, M., Oshima, S., Miyamoto, Y., Takeya, M. y Ogawa, H. (2008) "Class A macrophage scavenger receptor gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells specifically increase in patients with acute coronary syndrome", *Atherosclerosis*, 198(2), pp. 426-433.
 - Neuman, Å., Hohmann, C., Orsini, N., Pershagen, G., Eller, E., Kjaer, H.F., Gehring, U., Granell, R., Henderson, J., Heinrich, J., Lau, S., Nieuwenhuijsen, M., Sunyer, J., Tischer, C., Torrent, M., Wahn, U., Wijga, A.H., Wickman, M., Keil, T. y Bergström, A.; ENRIECO Consortium. (2012) "Maternal smoking in pregnancy and asthma in preschool children: a pooled analysis of eight birth cohorts", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(10), pp. 1037-1043.
 - O'Byrne, P.M. y Inman, M.D. (2003) "Airway hyperresponsiveness", *Chest*, 123(3 Suppl), pp. 411S-416S.
 - O'Byrne, P.M., Metev, H., Puu, M., Richter, K., Keen, C., Uddin, M., Larsson, B., Cullberg, M. y Nair, P. (2016) "Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with

- uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial”, *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(10), pp. 797-806.
- Ober, C. y Hoffjan, S. (2006) “Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery”, *Genes and Immunity*, 7(2), pp. 95-100.
 - Ober, C., Tan, Z., Sun, Y., Possick, J.D., Pan, L., Nicolae, R., Radford, S., Parry, R.R., Heinzmann, A., Deichmann, K.A., Lester, L.A., Gern, J.E., Lemanske, R.F. Jr., Nicolae, D.L., Elias, J.A. y Chupp, G.L. (2008) “Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function”, *The New England Journal of Medicine*, 358(16), pp. 1682-1691.
 - Ohar, J.A., Hamilton, R.F. Jr., Zheng, S., Sadeghnejad, A., Sterling, D.A., Xu, J., Meyers, D.A., Bleecker, E.R. y Holian, A. (2010) “COPD is associated with a macrophage scavenger receptor-1 gene sequence variation”, *Chest*, 137(5), pp. 1098-1107.
 - Organización Mundial de la Salud (2017): *Asma*. Disponible en: <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/> [Consulta: 17 de abril 2018].
 - Orozco-Levi, M., Garcia-Aymerich, J., Villar, J., Ramirez-Sarmiento, A., Anto, J.M. y Gea, J. (2006) “Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease”, *European Respiratory Journal*, 27(3), pp. 542-546.
 - Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M. y Akdis, C.A. (2010) “Role of Treg in immune regulation of allergic diseases”, *European Journal of Immunology*, 40(5), pp. 1232-1240.
 - Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M. y Akdis, C.A. (2014) “Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β ”, *Genes and Immunity*, 15(8), pp. 511-520.
 - Parulekar, A.D., Atik M.A. y Hanania, N.A. (2014) “Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma”, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 20(1), pp. 60-65.
 - Parulekar, A.D., Diamant, Z. y Hanania, N.A. (2017) “Role of biologics targeting type 2 airway inflammation in asthma: what have we learned so far?”, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23(1), pp. 3-11.
 - Paulin, L.M., Diette, G.B., Blanc, P.D., Putcha, N., Eisner, M.D., Kanner, R.E., Belli, A.J., Christenson, S., Tashkin, D.P., Han, M., Barr, R.G. y Hansel, N.N.; SPIROMICS Research Group. (2015) “Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(5), pp. 557-565.
 - Pavord, I.D., Beasley, R., Agusti, A., Anderson, G.P., Bel, E., Brusselle, G., Cullinan, P., Custovic, A., Ducharme, F.M., Fahy, J.V., Frey, U., Gibson, P., Heaney, L.G., Holt, P.G.,

- Humbert, M., Lloyd, C.M., Marks, G., Martinez, F.D., Sly, P.D., von Mutius, E., Wenzel, S., Zar, H.J. y Bush, A. (2018) "After asthma: redefining airways diseases", *Lancet*, 391 (10118), pp. 350-400.
- Pawankar, R., Canonica, G.W., Holgate, S.T. y Lockey, R.F. (2011) *WAO White Book on Allergy*. Reino Unido: World Allergy Organization (WAO).
 - Pelaia, G., Vatrella, A., Busceti, M.T., Gallelli, L., Calabrese, C., Terracciano, R. y Maselli, R. (2015) "Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma", *Mediators of Inflammation*, vol. 2015, Article ID 879783. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/879783> [Consulta: 2 de marzo 2018].
 - Pellegrino, R., Viegi G., Brusasco, V., Crapo, R.O., Burgos, F., Casaburi, R., Coates, A., van der Grinten, C.P., Gustafsson, P., Hankinson, J., Jensen, R., Johnson, D.C., MacIntyre, N., McKay, R., Miller, M.R., Navajas, D., Pedersen, O.F. y Wanger, J. (2005) "Interpretative strategies for lung function tests", *European Respiratory Journal*, 26(5), pp. 948-968.
 - Peters, M.C., Mekonnen, Z.K., Yuan, S., Bhakta, N.R., Woodruff, P.G. y Fahy, J.V. (2014) "Measures of gene expression in sputum cells can identify T_H2-high and T_H2-low subtypes of asthma", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), pp. 388-394.
 - Peters, S.P. (2014) "Asthma Phenotypes: Nonallergic (Intrinsic) Asthma", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(6), pp. 650-652.
 - Phillips, K., Osborne, J., Lewis, S., Harrison, T.W. y Tattersfield, A.E. (2004) "Time course of action of two inhaled corticosteroids, fluticasone propionate and budesonide", *Thorax*, 59(1), pp. 26-30.
 - Piechota, M., Banaszewska, A., Dudziak, J., Slomczynski, M. y Plewa, R. (2012) "Highly Upregulated Expression of CD36 and MSR1 in Circulating Monocytes of Patients with Acute Coronary Syndromes", *The Protein Journal*, 31(6), pp. 511-518.
 - Plaza Moral, V. y Comité Ejecutivo de la Guía Española para el Manejo del Asma. (2009) "GEMA (Guía española para el manejo del asma)", *Archivos de Bronconeumología*, 45(Supl. 7), pp. 1-35.
 - Pomés, A. y Villalba, M. (2007) "Alérgenos". En: Dávila González, I.J. y Peláez Hernández A. (Eds). *Tratado de Alergología*. Madrid: ergon, pp. 3-26.
 - Prakash, M., Bodas, M., Prakash, D., Nawani, N., Khetmalas, M., Mandal, A. y Eriksson, C. (2013) "Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in 'outside-in' signaling", *Cellular Signaling*, 25(7), pp. 1567-1573.

- Price, D., Fletcher, M. y van der Molen T. (2014) “Asthma control and management in 8,000 European patients: the REcognise Asthma and LInk to Symptoms and Experience (REALISE) survey”, *NPJ Primary Care Respiratory Medicine*, 24, p. 14009.
- Ptashne, M. (2007) “On the use of the word ‘epigenetic’ ”, *Current Biology*, 17(7), pp. R233-236.
- Pucci, S., Zonetti, M.J., Fisco, T., Polidoro, C., Bocchinfuso, G., Palleschi, A., Novelli, G., Spagnoli, L.G. y Mazzarelli, P. (2016) “Carnitine palmitoyl transferase-1A (CPT1A): a new tumor specific target in human breast cancer”, *Oncotarget*, 7(15), pp. 19982-19996.
- Radonjic-Hoesli, S., Valent, P., Klion, A.D., Wechsler, M.E. y Simon, H.U. (2015) “Novel targeted therapies for eosinophil-associated diseases and allergy”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, pp. 633-656.
- Raedler, D., Ballenberger, N., Klucker, E., Böck, A., Otto, R., Prazeres da Costa, O., Holst, O., Illig, T., Buch, T., von Mutius, E. y Schaub, B. (2015) “Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma”, *The Journal of Allergy Clinical Immunology*, 135(1), pp. 81-91.
- Reddel, H.K., Salome, C.M., Peat, J.K. y Woolcock A.J. (1995) “Which index of peak expiratory flow is most useful in the management of stable asthma?”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151(5), pp. 1320-1325.
- Reddel, H.K., Taylor, D.R., Bateman, E.D., Boulet, L-P., Boushey, H.A., Busse, W.W., Casale, T.B., Chanez, P., Enright, P.L., Gibson, P.G., de Jongste, J.C., Kerstjens, H.A., Lazarus, S.C., Levy, M.L., O'Byrne, P.M., Partridge, M.R., Pavord, I.D., Sears, M.R., Sterk, P.J., Stoloff, S.W., Sullivan, S.D., Szeffler, S.J., Thomas, M.D. y Wenzel S.E.; American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations.on behalf of the American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. (2009) “An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Controland Exacerbations. Standardizing Endpoints for Clinical Asthma Trials and Clinical Practice”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(1), pp. 59-99.
- Richards, L.B., Neerincx, A.H., van Bragt, J.J.M.H., Sterk, P.J., Bel, E.H.D. y Maitland-van der Zee, A.H. (2018) “Biomarkers and asthma management: analysis and potential applications”, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 18(2), pp. 96-108.
- Risch, N. y Merikangas, K. (1996) “The future of genetic studies of complex human diseases”, *Science*, 273(5281), pp. 1516-1517.

- Rolph, M.S., Sisavanh, M., Liu, S.M. y McKay, C.R. (2006) "Clues to asthma pathogenic from microarray expression studies", *Pharmacology & Therapeutics*, 109(1-2), pp. 284-294.
- Russell, R.J. y Brightling, C. (2017) "Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine", *Clinical Science (London)*, 131(14), pp. 1723-1725.
- Sääf, A.M., Tengvall-Linder, M., Chang, H.Y., Adler, A.S., Wahlgren, C.F., Scheynius, A., Nordenskjöld, M. y Bradley, M. (2008) "Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes", *PLoS One*, vol. 3(12), p. e4017. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004017> [Consulta: 14 de febrero 2018].
- Sakaguchi, S., Wing, K. y Yamaguchi, T. (2009) "Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg", *European Journal of Immunology*, 39(9), pp. 2331-2336.
- Sakthianandeswaren, A., Christie, M., D'Andreti, C., Tsui, C., Jorissen, R.N., Li, S., Fleming, N.I., Gibbs, P., Lipton, L., Malaterre, J., Ramsay, R.G., Phesse, T.J., Ernst, M., Jeffery, R.E., Poulsom, R., Leedham, S.J., Segditsas, S., Tomlinson, I.P., Bernhard, O.K., Simpson, R.J., Walker, F., Faux, M.C., Church, N., Catimel, B., Flanagan, D.J., Vincan, E. y Sieber, O.M. (2011) "PHLDA1 expression marks the putative epithelial stem cells and contributes to intestinal tumorigenesis", *Cancer Research*, 71(10), pp. 3709-3719.
- Schols, A.M., Soeters, P.B., Dingemans, A.M., Mostert, R., Frantzen, P.J. y Wouters, E.F. (1993) "Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation", *American Review of Respiratory Disease*, 147(5), pp. 1151-1156.
- Schroder, W.A., Le, T.T., Major, L., Street, S., Gardner, J., Lambley, E., Markey, K., MacDonald, K.P., Fish, R.J., Thomas, R. y Suhrbier, A. (2010) "A physiological function of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity", *Journal of Immunology*, 184(5), pp. 2663-2670.
- Serra-Batlles, J., Plaza, V., Morejón, E., Comella, A. y Brugués, J. (1998) "The costs of asthma according to the degree of severity", *European Respiratory Journal*, 12(6), pp. 1322-1326.
- Seys, S.F., Grabowski, M., Adriaensen, W., Decraene, A., Dilissen, E., Vanoirbeek, J.A., Dupont, L.J., Ceuppens, J.L. y Bullens, D.M.A. (2013) "Sputum cytokine mapping reveals an "IL-5, IL-17A, IL-25-high" pattern associated with poorly controlled asthma", *Clinical & Experimental Allergy*, 43(9), pp. 1009-1017.
- Shakib, F. y Furmonaviciene, R. (2000) "The significance of enzymic and other biological activities of proteins in relation to their capacity to serve as allergens", *Clinical & Experimental Allergy*, 30(8), pp. 1056-1057.

- Shrewsbury, S., Pyke, S. y Britton, M. (2000) "Meta-analysis of increased dose of inhaled steroid or addition of salmeterol in symptomatic asthma (MIASMA)", *The BMJ*, 320(7246), pp. 1368-1373.
- Silva, G.E., Sherrill, D.L., Guerra, S. y Barbee, R.A. (2004) "Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study", *Chest*, 126(1), pp. 59-65.
- Silvers, K.M., Frampton, C.M., Wickens, K., Pattemore, P.K., Ingham, T., Fishwick, D., Crane J, Town, G.I. y Epton, M.J.; New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group. (2012) "Breastfeeding protects against current asthma up to 6 years of age", *The Journal of Pediatrics*, 160(6), pp. 991-996.
- Simpson, J.L., Gibson, P.G., Yang, I.A., Upham, J., James, A., Reynolds, P.N., Hodge, S.; AMAZES Study Research Group. (2013) "Impaired macrophage phagocytosis in non-eosinophilic asthma", *Clinical & Experimental Allergy*, 43(1), pp. 29-35.
- Simpson, J.L., Phipps, S., Baines, K.J., Oreo, K.M., Gunawardhan, a L. y Gibson, P.G. (2014) "Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma", *European Respiratory Journal*, 43(4), pp. 1067-1076.
- Soyer, O.U., Akdis, M., Ring, J., Behrendt, H., Cramer, R., Lauener, R. y Akdis, C.A. (2013) "Mechanisms of peripheral tolerance to allergens", *Allergy*, 68(2), pp. 161-170.
- Stokes, J.R. y Casale, T.B. (2016) "Characterization of asthma endotypes: implications for therapy", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 117(2), pp. 121-125.
- Stoloff, S.W. y Boushey, H.A. (2006) "Severity, control, and responsiveness in asthma", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(3), pp. 544-548.
- Swartz, J.M., Byström, J., Dyer, K.D., Nitto, T., Wynn, T.A. y Rosenberg, H.F. (2004) "Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes", *Journal of Leukocyte Biology*, 76(4), pp. 812-819.
- Szeffler, S.J., Wenzel, S., Brown, R., Erzurum, S.C., Fahy, J.V., Hamilton, R.G., Hunt, J.F., Kita, H., Liu, A.H., Panettieri, R.A. Jr., Schleimer, R.P. y Minnicozzi, M. (2012) "Asthma outcomes: biomarkers", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(3 Suppl.), pp. S9-S23.
- Takahashi, K., Takeya, M. y Sakashita, N. (2002) "Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals", *Medical Electron Microscopy*, 35(4), pp. 179-203.
- Takayama, G., Arima, K., Kanaji, T., Toda, S., Tanaka, H., Shoji, S., McKenzie, A.N., Nagai, H., Hotokebuchi, T. y Izuhara, K. (2006) "Periostin: a novel component of subepithelial

fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, pp. 98-104.

- Tang, H., Sun, Y., Shi, Z., Huang, H., Fang, Z., Chen, J., Xiu, Q. y Li, B. (2013) “YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF- κ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration”, *Journal of Immunology*. 190(1), pp. 438-446.
- Taylor, D.R., Bateman, E.D., Boulet, L.P., Boushey, H.A., Busse, W.W., Casale, T.B., Chanez, P., Enright, P.L., Gibson, P.G., de Jongste, J.C., Kerstjens, H.A., Lazarus, S.C., Levy, M.L., O'Byrne, P.M., Partridge, M.R., Pavord, I.D., Sears, M.R., Sterk, P.J., Stoloff, S.W., Szefer, S.J., Sullivan, S.D., Thomas, M.D., Wenzel, S.E. y Reddel, H.K. (2008) “A new perspective on concepts of asthma severity and control”, *European Respiratory Journal*, 32(3), pp. 545-554.
- Taylor, D.R., Pijnenburg, M.W., Smith, A.D. y De Jongste, J.C. (2006) “Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation”, *Thorax*, 61(9), pp. 817-827.
- Tejera, P., O'Mahony, D.S., Owen, C.A., Wei, Y., Wang, Z., Gupta, K., Su, L., Villar, J., Wurfel, M. y Christiani, D.C. (2014) “Functional characterization of polymorphisms in the peptidase inhibitor 3 (elafin) gene and validation of their contribution to risk of acute respiratory distress syndrome”, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(2), pp. 262-272.
- The ENFUMOSA Study Group. (2003) “The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma”, *European Respiratory Journal*, 22(3), pp. 470-477.
- The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (2016): *Advocacy Manifesto Tackling the allergy crisis in Europe-Concerted policy action needed*. Disponible en http://www.eaaci.org/images/media/EAACI_Manifesto_brochure_Interactive.pdf [Consulta: 14 de febrero 2018].
- Thomsen, M., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A. y Dahl, M. (2011) “Scavenger receptor AI/II truncation, lung function and COPD: a large population-based study”, *Journal of Internal Medicine*, 269(3), pp. 340-348.
- Todisco T., de Benedictis F.M., Iannacci L., Baglioni, S., Eslami, A., Todisco, E. y Dottorini, M. (1993) “Mild prematurity and respiratory functions”, *European Journal of Pediatrics*, 152(1), pp. 55-58.
- Tollånes, M.C., Moster, D., Daltveit, A.K. y Irgens L.M. (2008) “Cesarean section and risk of severe childhood asthma: a population based cohort study”, *The Journal of Pediatrics*, 153(1), pp. 112-116.

- Tomokiyo, R., Jinnouchi, K., Honda, M., Wada, Y., Hanada, N., Hiraoka, T., Suzuki, H., Kodama, T., Takahashi, K. y Takeya, M. “Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors”, *Atherosclerosis*, 161(1), pp. 123-132.
- Tsai, Y.S., Tseng, Y.T., Chen, P.S., Lin, M.C., Wu, C.C., Huang, M.S., Wang, C.C., Chen, K.S., Lin, Y.C. y Wang, T.N. (2016) “Protective effects of elafin against adult asthma”, *Allergy and Asthma Proceedings*, 37(2), pp. 15-24.
- U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health y National Heart, Lung and Blood Institute (2007): *National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3. Guidelines for the diagnosis and management of asthma*. Disponible en: <https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/asthsumm.pdf> [Consulta: 14 de febrero 2018].
- U.S. National Library of Medicine (2018): What is precisión medicine? Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/precisionmedicine/definition>. [Consulta: 16 de junio 2018].
- van Eeden, S.F. y Terashima, T. (2000) “Interleukin-8 (IL-8) and the release of leukocytes from the bone marrow”, *Leukemia & Lymphoma*, 37(3-4), pp. 259-271.
- Vercelli, D. (2003). “Innate immunity: sensing the environment and regulating the regulators”, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 3(5), pp. 343-346.
- Vercelli, D. (2008) “Discovering susceptibility genes for asthma and allergy”, *Nature Reviews Immunology*, 8(3), pp. 69-82.
- Verrier, T., Solhonne, B., Sallenave, J.M. y Garcia-Verdugo, I. (2012) “The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(8), pp. 1377-1380.
- Vestbo, J., Hurd, S.S., Agustí, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P.J., Fabbri, L.M., Martinez, F.J., Nishimura, M., Stockley, R.A., Sin, D.D. y Rodríguez-Roisin, R. (2013) “Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(4), pp. 347-65.
- Vijverberg, S.J., Hilvering, B., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Maitland-van der Zee, A.H. y Koenderman, L. (2013) “Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside”, *Biologics*, 7, pp. 199-210.
- Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martínez, F.J., Anzueto, A., Barnes, P.J., Bourbeau, J., Celli, B.R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L.M., Frith, P., Halpin, D.M.G., López Varela, M.V., Nishimura, M., Roche, N., Rodríguez-Roisin, R., Sin, D.D., Singh, D., Stockley, R., Vestbo,

- J., Wedzicha, J.A. y Agustí, A. (2017) “Informe 2017 de la iniciativa global para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica: resumen ejecutivo de GOLD”, *Archivos de Bronconeumología*, 53(3), pp. 128-149.
- von Haehling, S. y Anker, S.D. (2010) “Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers”, *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 1(1), pp. 1-5.
 - Wadsworth, S., Sin, D. y Dorscheid, D. (2011) “Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma”, *Journal of Asthma and Allergy*, 4, pp. 77-86.
 - Wagener, A.H., Yick, C.Y., Brinkman, P., van der Schee, M.P., Fens, N. y Sterk, P.J. (2013) “Toward composite molecular signatures in the phenotyping of asthma”, *Annals of the American Thoracic Society*, 10, pp. S197-S205.
 - Wagener, A.H., Yick, C.Y., Brinkman, P., van der Schee, M.P., Fens, N. y Sterk, P.J. (2013) “Toward composite molecular signatures in the phenotyping of asthma”, *Annals of the American Thoracic Society*, 10 (Suppl.), pp. S197-S205.
 - Wang, C.H., Punde, T.H., Huang, C.D., Chou, P.C., Huang, T.T., Wu, W.H., Liu, C.H., Chung, K.F. y Kuo, H.P. (2015) “Fibrocyte trafficking in patients with chronic obstructive asthma and during an acute asthma exacerbation”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), pp. 1154-1162.
 - Wang, X., Li, Y., Luo, D., Wang, X., Zhang, Y., Liu, Z., Zhong, N., Wu, M. y Li, G. (2017) “Lyn regulates mucus secretion and MUC5AC via the STAT6 signaling pathway during allergic airway inflammation”, *Scientific Reports*, vol. 7, p. 42675. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep42675> [Consulta: 17 de mayo 2018].
 - Wenzel, S.E. (2012). “Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches”, *Nature Medicine*, 18(5), pp. 716-725.
 - West, A.R., Syong, H.T., Siddiqui, S., Pascoe, C.D., Murphy, T.M., Maarsingh, H., Deng, L., Maksym, G.N. y Bossé, Y. (2013) “Airway contractility and remodeling: links to asthma symptoms”, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), pp. 3-12.
 - Wilfried Karmaus, W., Ziyab, A.H., Everson, T. y Holloway, J.W. (2013) “Epigenetic mechanisms and models in the origins of asthma”, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 13(1), pp. 63-69.
 - Wills-Karp, M., Santeliz, J. y Karp, C.L. (2001) “The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis”, *Nature Reviews Immunology*, 1(1), pp. 69-75.

- Wood, L.G., Baines, K.J., Fu, J., Scott, H.A. y Gibson, P.G. (2012) “The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma”, *Chest*, 142(1), pp. 86-93.
- Woodruff, P.G., Boushey, H.A., Dolganov, G.M., Barker, C.S., Yang, Y.H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S.S., Dao-Pick, T.P., Pantoja, C., Erle, D.J., Yamamoto, K.R. y Fahy, J.V. (2007) “Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp. 15858-15863.
- Woodruff, P.G., Modrek, B., Choy, D.F., Jia, G., Abbas, A.R., Ellwanger, A., Koth, L.L., Arron, J.R. y Fahy, J.V. (2009) “T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180, pp. 388-395.
- World Allergy Organization (2015): *In-depth review of allergic rhinitis*. Disponible en: <http://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/in-depth-review-of-allergic-rhinitis> [Consulta: 16 de abril 2018].
- Yan, X., Chu, J.H., Gómez, J., Koenigs, M., Holm, C., He, X., Perez, M.F., Zhao, H., Mane, S., Martinez, F.D., Ober, C., Nicolae, D.L., Barnes, K.C., London, S.J., Gilliland, F., Weiss, S.T., Raby, B.A., Cohn, L. y Chupp, G.L. (2015) “Noninvasive analysis of the sputum transcriptome discriminates clinical phenotypes of asthma”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(10), pp. 1116-1125.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G. y van Ree, R. (2002) “Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis”, *Science*, 296(5567), pp. 490-494.
- Yoshimura, A., Gemma, A., Kataoka, K., Hosoya, Y., Noro, R., Seike, M., Kokubo, Y., Watanabe, M. y Kudoh, S. (2004) “Mutational analysis of the macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) gene in primary lung cancer”, *Journal of Nippon Medical School*, 71(2), pp. 99-104.
- Zhang, S., Zou, L., Yang, T., Yang, Y., Zhai, Z., Xiao, F. y Wang, C. (2015) “The sGC activator inhibits the proliferation and migration, promotes the apoptosis of human pulmonary arterial smooth muscle cells via the up regulation of plasminogen activator inhibitor-2”, *Experimental Cell Research*, 332(2), pp. 278-287.
- Zhao, P., Lu Y. y Liu, L. (2015) “Correlation of decreased expression of PHLDA1 protein with malignant phenotype of gastric adenocarcinoma”, *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 8, pp. 5230-5235.
- Zhou, Y., Zou, Y., Li, X., Chen, S., Zhao, Z., He, F., Zou, W., Luo, Q., Li, W., Pan, Y., Deng, X., Wang, X., Qiu, R., Liu, S., Zheng, J., Zhong, N., y Ran, P. (2014) “Lung function

and incidence of chronic obstructive pulmonary disease after improved cooking fuels and kitchen ventilation: a 9-year prospective cohort study”, *PLoS Medicine*, vol. 11(3), p. e1001621. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001621> [Consulta: 14 de febrero 2018].

- Zou, J., Young, S., Zhu, F., Gheys, F., Skeans, S., Wan, Y., Wang, L., Ding, W., Billah, M., McClanahan, T., Coffman, R.L., Egan, R. y Umland, S. (2002) “Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma”, *Genome Biology*, vol. 3(5), p. research0020.1-0020.13. Disponible en: <http://genomebiology.com/2002/3/5/research/0020> [Consulta: 17 de abril 2018].
- Zubeldia, J.M., Baeza, M.L., Jáuregui, I. y Senent, C.J. (2012) *Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA*. Bilbao: Fundación BBVA.

ANEXO

ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Baos, S., Calzada, D., Cremades, L., Sastre, J., Quiralte, J., Florido, F., Lahoz, C. y Cárda, B. (2016) “Data set on a study of gene expression in peripheral samples to identify biomarkers of severity of allergic and nonallergic asthma”, *Data in Brief*, 10, pp. 505-510.
- Baos, S., Calzada, D., Cremades, L., Sastre, J., Quiralte, J., Florido, F., Florido, F., Lahoz, C. y Cárda, B. (2017) “Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma”, *Molecular Immunology*, 82, pp. 34-45.
- Baos, S., Calzada, D., Cremades-Jimeno, L., Sastre, J., Picado, C., Quiralte, J., Florido, F., Lahoz, C. y Cárda, B. (2018) “Nonallergic asthma and its severity: biomarkers for its discrimination in peripheral samples”, *Frontiers in Immunology*, Disponible en <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01416>.

PATENTE DERIVADA DE ESTA TESIS DOCTORAL

Parte de los resultados expuestos en esta tesis han sido protegidos por una solicitud de patente:

- Número de solicitud P201730947: “Biomarcadores diferenciales del asma”, con informe sobre el estado de la técnica favorable a 19 de enero del 2018.

ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Cárda, B., Calzada, D., Baos, S., Aguerri, M., Quiralte, J. y Lahoz, C. (2014) “Polymorphisms of tumor necrosis factor-, transforming growth factor-, and interleukin-10 in asthma associated with olive pollen sensitization”, *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, p. 276345. Disponible en <https://doi.org/10.1155/2014/276345>.
- Calzada, D., Aguerri, M., Baos, S., Montaner, D., Mata, M., Dopazo, J., Quiralte, J., Florido, F., Lahoz, C. y Cárda, B. (2015) “Therapeutic targets for olive pollen allergy defined by gene markers modulated by Ole e 1-derived peptides”, *Molecular Immunology*, 64(2), pp. 252-261.
- Calzada, D., Aguerri, M., Baos, S., Lahoz, C. y Cárda, B. (2015) “Epigenetic regulation analyses of Foxp3 in olive pollen allergy”, *Journal Investigational of Allergology and Clinical Immunology*, 25(3), pp. 222-224.
- Calzada, D., Baos, S., Cremades, L. y Cárda, B. (2018) “New treatments for allergy: advances in peptide immunotherapy”, *Current Medicinal Chemistry*, 25(19), pp. 2215-2232.

- Calzada, D., Baos, S., Cremades, L. y Cárđaba, B. (2018) “Immunological mechanisms in allergic diseases and allergen tolerance: the role of Treg cells”, *Journal of Immunology Research*, vol. 2018, Article ID 6012053. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/6012053>.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Data set on a study of gene expression in peripheral samples to identify biomarkers of severity of allergic and nonallergic asthma



Selene Baos^{a,b}, David Calzada^a, Lucía Cremades^a,
Joaquín Sastre^{b,c}, Joaquín Quiralte^d, Fernando Florido^e,
Carlos Lahoz^{a,b}, Blanca Cárdaa^{a,b,*}

^a Immunology Department, IIS- Jiménez Díaz Foundation, UAM, Madrid, Spain

^b CIBERES, CIBER of Respiratory Diseases, Spain

^c Allergy Department, Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

^d Allergy Department, Virgen del Rocío University Hospital, Seville, Spain

^e Allergy Department, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2016

Received in revised form

13 December 2016

Accepted 15 December 2016

Available online 22 December 2016

Keywords:

Asthma

Allergy

Biomarkers

Gene expression

Peripheral samples

ABSTRACT

This article contains information related to the research article entitled “Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma” (S. Baos, D. Calzada, L. Cremades, J. Sastre, J. Quiralte, F. Florido, C. Lahoz, B. Cárdaa, In press). Specifically, the clinical criteria established for selecting the study population ($n=104$ subjects) are described. Moreover, this article describes the criteria for selecting the 94 genes to be analyzed in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), it is provided a description of these genes and a Table with the genes most differentially expressed by clinical phenotypes and, finally it is detailed the experimental methodology followed for studying the protein expression of MSR1 (macrophage scavenger receptor 1), one of the genes evaluated in the research.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.12.012>

* Correspondence to: Immunology Department, IIS- Jiménez Díaz Foundation, Avda Reyes Católicos N° 2, 28040 Madrid, Spain. Fax: + 34 915448246.

E-mail address: bcardaba@fjd.es (B. Cárdaa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.12.035>

2352-3409/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	Biology
More specific subject area	Immunology, biomarkers, asthma, allergy.
Type of data	Table, text file.
How data was acquired	Bibliographic search, qRT-PCR, Western Blot.
Data format	Raw
Experimental factors	Subjects' diagnosis was done according to the GEMA (Spanish Guide for Asthma Management) classification. PBMCs were extracted from peripheral blood through gradient separation. RNA and protein from PBMCs were extracted with TRIzol's method.
Experimental features	Genes selected were according to the 3 criteria stated. Through qRT-qPCR, gene expression differences among clinical groups were studied. The highest statistically significant data among the three clinical phenotypes are showed. Western blot was done to determine the protein expression of one of the genes studied.
Data source location	Madrid, Spain; Seville, Spain; Granada, Spain.
Data accessibility	Data is with this article.

Value of the data

- Data presented here shows the selection and clinical criteria [1] of the study population.
- Gene selection criteria of interesting candidates to be asthma' biomarkers are provided in order to understand the validity of genes studied.
- A gene list of candidate biomarkers of asthma and allergy diseases is suggested for studying.
- A summary of the most differential genes among clinical phenotypes is showed. These data could be important for future biomarkers analyses.
- Western-blot method for MSR1 expression on protein extracted from PBMCs could be useful for future research.

1. Data

The data shown in the article give information on the criteria of patients' selection and the criteria for choosing genes to be studied as candidate biomarkers for these diseases in peripheral samples. The specific western-blot method for the analysis of MSR1 expression on protein extracted from PBMCs is provided. Table 1 provides a list of candidate genes to be validated as relevant biomarkers and Table 2 summarize the possible biomarkers that differentiate asthmatic and allergic phenotypes.

2. Experimental design, materials and methods

2.1. Subjects

The study population comprised 104 unrelated subjects, 30 healthy control (HC) subjects, 30 patients with nonallergic asthma (NA), 30 with allergic asthma (AA), and 14 nonasthmatic allergic (AR) subjects. The samples of the groups with asthma came from the asthma biobank of the CIBERES (IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, Madrid). A biorepository in which were included samples from clinically well-characterized subjects, from 5 Spanish Hospitals participant of this network (Fundación

Table 1

List of the 94 genes studied.

Gene symbol	Gene name	Selection criteria	Detector
ADAM33	ADAM metallopeptidase domain 33	3	ADAM33-Hs00905552_m1
ADRB1	adrenoceptor beta 1	2	ADRB1-Hs02330048_s1
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	2	AKT1-Hs00178289_m1
ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase	1	ALOX15-Hs00993765_g1
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	2	ALOX5-Hs01095330_m1
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	2	APAF1-Hs00559441_m1
BAX	BCL2-associated X protein	2	BAX-Hs00180269_m1
C3AR1	complement component 3a receptor 1	2	C3AR1-Hs00269693
CCL11	chemokine (C-C motif) ligand 11	3	CCL11-Hs00237013_m1
CCL17	chemokine (C-C motif) ligand 17	3	CCL17-Hs00171074_m1
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	3	CCL5-Hs00982282_m1
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	2	CD40-Hs01002913_g1
CD48	CD48 molecule	2	CD48-Hs00914738_m1
CD86	CD86 molecule	2	CD86-Hs01567026_m1
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	1	CHI3L1-Hs00609691_m1
CLCA1	chloride channel accessory 1	1	CLCA1-Hs00976287_m1
CPA3	carboxypeptidase A3 (mast cell)	1	CPA3-Hs00157019_m1
CRTAP	cartilage associated protein	2	CRTAP-Hs00197261_m1
CTSC	cathepsin C	1	CTSC-Hs00175188_m1
CTSG	cathepsin G	1	CTSG-Hs01113415_g1
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	1	CX3CR1-Hs01922583_s1
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1	DUSP1-Hs00610256_g1
RNASE3	ribonuclease, RNase A family, 3	3	RNASE3-Hs01923184_s1
EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	1	EIF5A-Hs00744729_s1
FOXP3	forkhead box P3	3	FOXP3-Hs01085834_m1
FPR3	formyl peptide receptor 3	2	FPR3-Hs00266666_s1
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1	GADD45B-Hs04188837_g1
GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	1	GPX3-Hs01078668_m1
GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	2	GZMH-Hs00277212_m1
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	1, 2	HLA-DQB1-Hs03054971_m1
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	2	HLA-DRB1-Hs99999917_m1
IFNG	interferon, gamma	3	IFNG-Hs00989291_m1
IL-10	interleukin 10	2	IL10-Hs00961622_m1
IL13	interleukin 13	1	IL13-Hs00174379_m1
IL-17	interleukin 17A	3	IL17A-Hs00174383_m1
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	1	IL1R1-Hs00991002_m1
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	1	IL1R2-Hs01030384_m1
IL-2	interleukin 2	3	IL2-Hs00174114_m1
IL-25	interleukin 25	3	IL25-Hs03044841_m1
IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	1	IL2RB-Hs01081697_m1
IL33	interleukin 33	1	IL33-Hs00369211_m1
IL-4	interleukin 4	3	IL4-Hs00174122_m1
IL4R	interleukin 4 receptor	3	IL4R-Hs00166237_m1
IL5	interleukin 5	1	IL5-Hs01548712_g1
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	1, 2	IL6-Hs00985639_m1
IL8	interleukin 8	1	IL8-Hs00174103_m1
IL-9	interleukin 9	3	IL9-Hs00914237_m1
IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	3	IRAK3-Hs00936103_m1
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	2	ITGAL-Hs00158218_m1
ITGB7	integrin, beta 7	2	ITGB7-Hs01565750_m1
ITGB8	integrin, beta 8	2	ITGB8-Hs00174456_m1
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	2	LCK-Hs00178427_m1
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	3	LGALS3-Hs00173587_m1
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	2	LYN-Hs00176719_m1
MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	2	MAPK13-Hs00559623_m1
MSR1	macrophage scavenger receptor 1	2	MSR1-Hs00234007_m1
MUC2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	1	MUC2-Hs03005103_g1
MUC5AC	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	1	MUC5AC-Hs00873651_Mh

Table 1 (continued)

Gene symbol	Gene name	Selection criteria	Detector
MUC5B	mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming	1	MUC5B-Hs00861595_m1
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	1	NCF2-Hs01084940_m1
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	2	NFATC1-Hs00542678_m1
NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	1	NFKBIZ-Hs00230071_m1
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	2	NLRP3-Hs00918082_m1
NOS2A	nitric oxide synthase 2, inducible	1	NOS2-Hs01075529_m1
ORMDL3	ORM1-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	1	ORMDL3-Hs00918021_m1
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	1	PHLDA1-Hs00705810_s1
PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived	1	PI3-Hs00160066_m1
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	1	POSTN-Hs01566734_m1
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	2	PRKACA-Hs00427274_m1
PRKACB	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	2	PRKACB-Hs01086757_m1
PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53 kDa	2	PTGER2-Hs04183523_m1
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	3	PTPRC-Hs04189704_m1
S100A9	S100 calcium binding protein A9	1	S100A9-Hs00610058_m1
S1PR5	sphingosine-1-phosphate receptor 5	2	S1PR5-Hs00928195_s1
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	1	SCD-Hs01682761_m1
SELL	selectin L	2	SELL-Hs00174151_m1
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	1, 2	SERPINB2-Hs01010736_m1
SERPINB4	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	1	SERPINB4-Hs01691258_g1
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	2	SMURF1-Hs00905759_m1
SOS1	son of sevenless homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	2	SOS1-Hs00362308_m1
SPN	sialophorin	2	SPN-Hs01872322_s1
SPP1	secreted phosphoprotein 1	3	SPP1-Hs00959010_m1
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91 kDa	3	STAT1-Hs01013996_m1
SVIL	supervillin	1	SVIL-Hs00931028_m1
TAGAP	T-cell activation RhoGTPase activating protein	2	TAGAP-Hs00299284_m1
TCF21	transcription factor 21	1	TCF21-Hs00162646_m1
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	2	TGFB1-Hs00998133_m1
TLR4	toll-like receptor 4	2	TLR4-Hs00152939_m1
TNFA	tumor necrosis factor	3	TNF-Hs01113624_g1
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1	TNFAIP3-Hs00234713_m1
TRIM37	tripartite motif containing 37	2	TRIM37-Hs00248701_m1
TSLP	thymic stromal lymphopoietin	1	TSLP-Hs00263639_m1
VCAN	versican	2	VCAN-Hs00171642_m1
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70 kDa	2	ZAP70-Hs00896347_m1

Selection criteria were: 1. Relevant genes by differential expression or SNP studies in asthma/allergy, which were found in more than one independent work following a literature search; 2. Genes with differential expression found in results of previous studies from our laboratory; 3. Genes of interest because of their role in cellular plasticity, inflammation and/or regulation that could have been excluded by the other criteria. The detector refers to the specific primer of each gene used to carry out qRT-PCR.

Jiménez Díaz Hospital and Doce de Octubre Hospital from Madrid, Doctor Negrín Hospital from Las Palmas de Gran Canaria, *Clínic* Hospital and *Sant Pau* Hospital both from Barcelona). These patients fulfilled the following criteria: severe, mild, or moderate asthma diagnosis assigned according to the GEMA [1]; no treatment was given before or during the collection of the samples. Pulmonary function test was determined by percentage of forced vital capacity (FVC) and forced vital volume in one second (FVE₁). Patients with allergic asthma showed a positive skin prick test result for some of the airborne allergens from a battery of common allergens.

HCs were healthy subjects with no history of respiratory diseases. HCs and patients with allergy (rhinitis) without asthma were recruited and diagnosed at the Allergy Service of two hospitals in

Table 2

Differential genes among clinical phenotypes.

Comparison	Number of genes with significant differential expression*	Number of genes upregulated	Number of genes downregulated	Genes statistically significant with a RQ > 10
NAvs AA	74	74 in NA	–	<i>CCL5, CHI3L1, CTSG, GMH, IL1-R2</i>
NAvs AR	66	64 in NA	2 in NA	<i>CCL5, CRTAP, GPX3, HLA-DQB1, IL-10, IL2RB, MSR1, NLRP3, PHLDA1, SERPINB2, PI3</i>
AAvs AR	14	4 in AA	10 in AA	<i>CHI3L1, CPA3, CTSG, PI3</i>

NA: Nonallergic asthma group; AA: allergic asthma group; AR: nonasthmatic allergy (rhinitic) group; RQ: relative quantification.

* Significance established at an adjusted $p < 0.05$ and a RQ < -2 or > 2 . All genes mentioned in the last column are overexpressed except the ones marked in bold which are underexpressed.

Andalusia (Spain), Virgen del Rocío University Hospital from Seville, and San Cecilio University Hospital from Granada, Spain. AR patients fulfilled the following criteria: seasonal rhinitis without asthma, positive skin prick test for some of the airborne allergens from a battery of common allergens, and no previous immunotherapy.

HC and AR biological samples that were not used in this work were stored in the FJD Biobank, IIS-Fundación Jiménez Díaz Madrid.

Informed consent was obtained from each subject. Ethical approval for the study was obtained from the Ethical and Research Committee of the participating hospitals.

2.2. Gene selection criteria

Ninety-four genes (Table 1) were chosen following three main criteria for a gene expression analysis [2] through quantitative real time PCR with RNA of the study population described before:

- Relevant genes associated with asthma and allergic diseases in more than one independent work, selected after a Pubmed literature search of analyses of differential gene expression, or polymorphic variants (SNPs) related to the disease.
- Relevant genes previously described by our group [3].
- Genes excluded by the other two criteria but that could be interesting due to their implication in cellular plasticity, inflammation, and/or regulation of the disease.

2.3. Gene expression analysis

Gene expression analysis between the 3 clinical groups is summarized in Table 2. The statistical analysis for testing differential gene expression was performed by using the StatMiner program (<http://www.integromics.com/StatMiner>). This program follows a simple, step-by-step analysis workflow guide that includes parametric, non-parametric, and paired tests for relative quantification of gene expression, as well as 2-way ANOVA for two-factor differential expression analysis. Significance was defined by RQ (relative quantification) < -2 or > 2 and corrected P value (< 0.05) adjusting the P value with the Benjamini–Hochberg FDR method.

2.4. MSR1 protein analysis by Western Blot

The protein expression of MSR1 was analyzed [2]. Specific protein was extracted from PBMCs (10^6 cells) using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and quantified by the BCA method (Thermo Scientific, Rockford, IL USA). Western blot used was the Invitrogen WesternBreeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit (Life Technologies) following the

manufacturer's instructions with minor modifications. Briefly, 40 µg of proteins from each subject were running in a 12% SDS-PAGE Novex Bolt™ Mini gels (Life Technologies) and transferred using the Invitrogen Blot® Dry Blotting System to nitrocellulose membranes. After 30 min of incubation with blocking solution, were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human polyclonal CD204/Macrophage Scavenger Receptor I antibody (dilution 1:2500) (Thermo Scientific) as specific antibody and, with a rabbit anti-human monoclonal β-Actin antibody (dilution 1:1000) (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) as control. The result was visualized by chemiluminescence using a luminescent image analyzer: ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Data of MSR1 results were relativize to β-Actin expression.

Funding sources

This work was supported in part by research grants PI13/01730 co-supported by FEDER, CIBERES (ISCIII, 0013) and Biobank (PT13/0010/0012) from the Fund for Health Research (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness). S. Baos was supported by CIBERES (ISCIII, 0013) and Conchita Rábago Foundation. D. Calzada by *Conchita Rábago* Foundation, Madrid, Spain. L. Cremades was supported by a contract from MINECO (PEJ-2014-A-31609, *Sistema de Garantía Juvenil*), cofinanced by European Social Fund (ESF) and Youth Employment Initiative (YEI).

Acknowledgements

We are grateful to the funders of this work and to Oliver Shaw for English corrections.

Transparency document. Supporting information

Transparency data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.12.035>.

References

- [1] GEMA (Guía española del manejo del asma), Arch. Bronconeumol. 45 (2009) 2–35.
- [2] S.Baos, D.Calzada, L.Cremades, J.Sastre, J.Quirarte, F.Florido, et al. Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma. Molecular Immunol. In press.
- [3] M. Aguerri, D. Calzada, D. Montaner, M. Mata, F. Florido, J. Quirarte, et al., Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy, J. Biol. Regul. Homeost. Agents 27 (2013) 337–350.



Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma



Selene Baos^{a,b}, David Calzada^a, Lucía Cremades^a, Joaquín Sastre^{b,c}, Joaquín Quirarte^d, Fernando Florido^e, Carlos Lahoz^{a,b}, Blanca Cárdbaba^{a,b,*}

^a Immunology Department, IIS-Jiménez Díaz Foundation, UAM, Madrid, Spain

^b CIBERES, CIBER of Respiratory Diseases, Spain

^c Allergy Department, Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

^d Allergy Department, Virgen del Rocío University Hospital, Seville, Spain

^e Allergy Department, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2016

Received in revised form 2 December 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 21 December 2016

Keywords:

Asthma

Allergy

Biomarkers

Gene expression

Severity

ABSTRACT

Asthma is a complex, chronic respiratory disease with a wide clinical spectrum. Use of high-throughput technologies has generated a great deal of data that require validation. In this work the objective was to validate molecular biomarkers related to asthmatic disease types in peripheral blood samples and define their relationship with disease severity. With this purpose, ninety-four previously described genes were analyzed by qRT-PCR in 30 healthy control (HC) subjects, 30 patients with nonallergic asthma (NA), 30 with allergic asthma (AA), and 14 patients with allergy (rhinitis) but without asthma (AR). RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using the TRIzol method. After data normalization, principal component analysis (PCA) was performed, and multiple approaches were used to test for differential gene expression. Relevance was defined by RQ (relative quantification) and corrected *P* value (<0.05). Protein levels of IL-8 and MSR1 were determined by ELISA and Western blot, respectively.

PCA showed 4 gene expression clusters that correlated with the 4 clinical phenotypes. Analysis of differential gene expression between clinical groups and HCs revealed 26 statistically relevant genes in NA and 69 in AA. Protein interaction analysis revealed IL-8 to be a central protein. Average levels of IL-8 were higher in the asthma patients' sera (NA: 452.28 ± 357.72 , AA: 327.46 ± 377 pg/ml) than in HCs (286.09 ± 179.10), but without reaching statistical significance. Nine genes, especially MSR1, were strongly associated with severe NA.

In conclusion, several molecular biomarkers of asthma have been defined, some of which could be useful for the diagnosis or prognosis of disease severity.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Asthma is an inflammatory disorder of the airways characterized by chronic inflammation and hyperresponsiveness (AHR) as well as symptoms such as recurrent wheezing, cough, and shortness of breath. According to the World Health Organization, asthma is the most common chronic disease in children, affecting more

than 300 million children and adults (Mukherjee and Zhang, 2011). Many different clinical phenotypes of asthma have been identified. There are 10%–33% of individuals with nonallergic asthma (NA) or subjects with asthma in whom allergic sensitization cannot be demonstrated. However, allergic mechanisms have been implicated in 50%–80% of asthmatic patients and in approximately 50% of individuals with severe asthma (D'Amato et al., 2014; Holgate, 2012). For this reason, asthma has been associated with type 2 airway inflammation, which is characterized by elevated levels of immunoglobulin E, eosinophils, and several interleukins (IL) such as IL-4, IL-5, IL-13, and IL-9.

Asthma severity reflects the intensity of the disease. The Spanish Guidelines for the Management of Asthma divide asthma into the following categories: intermittent, mild, moderate, and severe

Abbreviations: GEMA, Spanish guide for asthma management; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; PCA, principal component analysis.

* Corresponding author at: Immunology Department, IIS- Jiménez Díaz Foundation, Avda Reyes, Católicos N° 2, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: bcardaba@fjd.es (B. Cárdbaba).

persistent. These categories are assigned according to day and night symptoms, frequency of medication intake, activity limitation, pulmonary function, and exacerbations (GEMA., 2009).

It is well-known that reaction to treatment varies between different asthma patients. Given this clinical heterogeneity, many authors have begun classifying asthma into “endotypes” (Fajt et al., 2015; George et al., 2015; Wenzel., 2012; Anderson, 2008). An endotype consists of several mechanisms that cannot be clearly separated. Their description may rely on biomarkers, which can be the signature of a complex underlying pathway or a key molecule associated with or directly playing a role in a particular disease endotype (Agache et al., 2015). New strategies for discovery and validation of biomarkers such as the –omics approaches have been used to explore the mechanisms responsible for the asthma endotypes present in different tissues; these approaches have been used in airway epithelial cells (Woodruff et al., 2009; Woodruff et al., 2007) and in sputum (Baines et al., 2010), but fewer studies have been done in human peripheral blood and, in particular, in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The studies that have been done have helped to confirm previous results and have identified new genes that need to be investigated (Faiz and Burgess, 2012). Several biomarkers have been described for the Th2 (T-helper 2) endotype, such as exhaled NO, sputum or blood eosinophils, total serum IgE or specific IgE, serum periostin, sputum or epithelial-cell (bronchial or nasal) gene signature, or salivary inflammatory mediator profile. Recently, the first results of molecularly targeted therapies have been reviewed (Fajt et al., 2015). In asthmatic patients with Th2 inflammation, consistent efficacy was observed in therapies targeting the Th2 cytokines, while in patients lacking Th2 biomarkers, biologically targeted therapies are still in their infancy.

Given all this information, our aim was to validate and to define molecular biomarkers that differentiate asthma from allergic diseases and predict disease severity in non-invasive samples obtained from a clinically well-characterized population.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The study population comprised 104 unrelated subjects, 30 healthy control (HC) subjects, 30 patients with nonallergic asthma (NA), 30 patients with allergic asthma (AA) (allergic to airborne allergens), and 14 patients with allergy (rhinitis) but without asthma (AR) (allergic to airborne allergens). The selection criteria appear in Baos et al., submitted.

Informed consent was obtained from each subject. Ethical approval for the study was obtained from the ethical and research committees of the participating hospitals.

2.2. PBMC isolation and RNA extraction

PBMCs were isolated from heparin-containing peripheral blood samples by gradient centrifugation using Lymphoprep (Comercial Rafer, Zaragoza, Spain) following the manufacturer's instructions. Total RNA was isolated from PBMCs (10^6 cells) using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was quantified and its purity was checked by spectrophotometry with the nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) system.

2.3. Gene selection criteria

Ninety-four genes (Table 1, Baos et al., submitted) were selected from previous studies according to the criteria described in Baos et al., submitted.

2.4. Differential gene expression by qRT-PCR

Three hundred nanograms of RNA from each subject was analyzed in the Scientific Park of Cantoblanco (Madrid, Spain) by quantitative real-time PCR using the TaqMan Gene Expression System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 384-well microfluidic cards (Applied Biosystems) that included the 94 selected genes and 18S as a reference gene. Briefly, reverse transcription was performed using “High capacity RNA to cDNA kit” (Applied Biosystems). Real time PCR was performed using Taqman Gene Expression and the HT7900 System (Applied Biosystems) with 40 amplification cycles. The results were analyzed with the SDS software (Applied Biosystems).

Specific mRNA expression from each gene was analyzed in triplicate, normalized into 18S rRNA gene, and calculated according to the cycle threshold (Ct) method. After data normalization, the global gene expression of the samples was checked by an unsupervised statistical procedure called principal component assay (PCA). This method reduces multidimensional data to fewer dimensions to facilitate analysis and visualization. That is, the method groups the data according to a distance without using any external information to organize the groups. PCA is very useful for identifying the most significant patterns of data.

2.5. Measurement of soluble cytokine levels

Levels of IL-8 in the subjects' serum were analyzed using the human IL-8 ELISA kit by Diaclone (Besançon Cedex, France) following the manufacturer's protocol.

2.6. MSR1 protein analysis

MSR1 determination was analyzed in 9 HCs and 18 NA patients (8 severe NA patients and 10 with moderate-mild diagnosis) by Western blot. Specific details are summarized in Baos et al., submitted.

2.7. Statistical analysis

Multiple comparisons were used to test for differential gene expression by using the StatMiner program (<http://www.integromics.com/StatMiner>). This program follows a simple, step-by-step analysis workflow guide that includes parametric, non-parametric, and paired tests for relative quantification of gene expression, as well as 2-way ANOVA for two-factor differential expression analysis. Significance was defined by RQ (relative quantification) <-2 or >2 and corrected P value (<0.05) adjusting the P value with the Benjamini-Hochberg FDR method. DAVID software v6.7 was used for functional gene analyses (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) and the STRING v10 free program (<http://string-db.org/>) was used for the analysis of protein interactions.

3. Results

3.1. Subjects

The demographic and clinical parameters of the population studied are summarized in Table 1. Mean age was slightly different among the groups: the NA subjects were significantly older than the other groups, and the AR subjects were the youngest, with statistically significant differences when compared to the HC and NA groups.

The mean levels of total IgE were increased in the 2 groups of allergic subjects ($P < 0.05$) compared with both the HC and NA groups.

Percentages of FEV₁ and FVC were similar between the 2 asthma groups; however, severe NA vs moderate-mild NA patients showed

Table 1
Characteristics of the study population.

	N	Age	Smoking	Clinical diagnosis	Total IgE	% FVC	% FEV ₁
Healthy control (HC) subjects	30	45.66 ± 12.39	92.86% non-smokers 7.14% smokers 0% former smokers	Not applicable	75.02 ± 128.21	–	–
Nonallergic asthmatic (NA) subjects	30	58.03 ± 13.14*	73.33% non-smokers 10% smokers 16.67% former smokers	50% severe asthma 30% moderate asthma 20% mild asthma	No allergic symptoms	82.04 ± 80.63	81.11 ± 22.69 75.18 ± 22.82
Asthmatic allergic (AA) subjects	30	42.37 ± 15.44#	68.97% non-smokers 6.90% smokers 24.14% former smokers	50% severe asthma 26.7% moderate asthma 23.3% mild asthma	43.3% allergic to pollen 56.7% not allergic to pollen	371.64 ± 437.69*#	75.53 ± 16.58 73.33 ± 16.28
Nonasthmatic allergic (AR) subjects	14	34 ± 8.86*#	85.71% non-smokers 14.29% smokers 0% former smokers	No asthmatic symptoms	100% allergic to pollen	250.65 ± 249.07*#	–

% FVC: percentage of predicted value of forced vital capacity; % FEV₁: percentage of predicted value of forced expiratory volume in 1 s.

* Statistically significant comparison ($P < 0.05$) between HC and patients group.

Statistically significant comparison ($P < 0.05$) between NA and selected group.

statistically significant differences (66.33 ± 16.62 vs 85.38 ± 21.03 , $P = 0.0127$ in % FEV₁; 69.93 ± 19.94 vs 94 ± 19.52 , $P = 0.0031$ in % FVC) (data not shown).

The number and percentage of eosinophils were higher in severe AA patients (739.5 ± 1180 , 5.88 ± 3.69) than in severe NA patients (264 ± 152 , 3.72 ± 2.47), but without reaching statistical significance (data not shown).

3.2. Gene expression clustering according to clinical group

Global gene expression analysis of the 94 genes in the 104 RNA samples was performed. After qRT-PCR data normalization, the unsupervised analysis by PCA showed 4 clusters that correlated with the 4 clinical groups (Fig. 1A). Using an unsupervised hierarchical model by which samples are compared two by two, we were able to cluster the samples according to gene expression, with a 100% specificity and sensitivity for NA and AA vs HC subjects (Fig. 1B and C). The sensitivity and specificity were slightly lower—92.86% and 96.3%, respectively—for discrimination of AR vs HC. Distinguishing between NA and AA was the most difficult according to gene expression, with a sensitivity of 66.6% and a specificity of 61.5%. Asthmatic (AA and NA) samples vs AR samples showed clustering exhibiting a sensitivity of 78.57%, and the specificity was 88.4% for AA and of 90% for NA.

To define specific gene profiles related with each clinical condition, several types of statistical analyses were performed. Ten genes (*CLCA1*, *IL17A*, *IL-25*, *IL-33*, *IL-5*, *IL-9*, *MUC5AC*, *POSTN*, *SERPINB4*, and *TCF21*) were found to be indeterminate in all the samples, and 10 genes (*ADAM33*, *CCL17*, *IL-13*, *MUC5B*, *MUC2*, *NOS2*, *TSLP*, *CCL11*, *DRB1*, and *IL-4*) were unable to be assessed because they were detected only in some conditions or had inconsistent data. Firstly, differential gene-expression comparisons of the 3 clinical groups against the HC group were carried out. Seventy-two genes (76.6% of the total) were differential between HC and at least one of the clinical conditions. The 2 allergic groups (AA and AR) showed a higher number of statistically different genes relative to the HC group and the NA group: 69 (1 upregulated *MSR1* and 68 downregulated) in the AA group, 66 in the AR group (all downregulated), and 26 (16 upregulated and 10 downregulated) in the NA group. Of these differentially expressed genes, 22 were common to the 3 clinical groups, 42 were common to both groups of allergic subjects, and one (*MSR1*) was common to the 2 groups with asthma (allergic and nonallergic). On the other hand, *SERPINB2* was significantly overexpressed only in the NA group. In contrast, *ADRB1*, *ALOX15*, *CTSG*, and *CX3CR1* were significantly underexpressed only in the AA group. None of the analyzed genes was differentially expressed in only the AR group.

Functional analysis of the differential genes in each clinical condition compared to the HC group was carried out using the DAVID program, which analyses gene-set enrichment according to functional pathways and biological processes. The main functional annotation clusterings for each clinical condition are shown in Tables 2, 3, and 4. The main cluster is the one related with inflammation in allergic (asthmatic and nonasthmatic) conditions and with extracellular compounds in NA patients. The enrichment score was higher in allergic conditions.

This cluster analysis correlated well with the results of the functional protein analysis by the STRING program (Fig. 2), which shows the complex and strong interactions in allergic clinical phenotypes and a clearer network in the NA clinical phenotype, where there is a central nucleus composed of IL-8 and TNF.

In order to find genes specifically related with asthma and/or allergy, the next step was the analysis of differences in gene expression among the 3 clinical groups. A comparison between NA and AA subjects showed 74 genes overexpressed in the NA group. Five genes showed highest differentiation ($RQ > 10$): *CCL5*, *CHI3L1*, *CTSG*, *GZMH*, and *IL1-R2*. Comparison of NA and AR subjects showed 66 genes as differentially expressed, 64 of which were upregulated and only 2, *CHI3L1* and *PI3*, were downregulated in the NA group. Gene selection using a more strict criterion ($RQ > 10$) revealed that 10 genes were highly overexpressed in asthmatic subjects: *CCL5*, *CRTAP*, *GPX3*, *HLA-DQB1*, *IL-10*, *IL2RB*, *MSR1*, *NLRP3*, *PHLDA1*, and *SERPINB2*. *PI3* was the only downregulated gene. Finally, as seen in a comparison between allergic subjects (i.e., AA vs AR), 14 genes were differentially expressed, 4 of which were upregulated (*IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1*, and *SERPINB2*) and 10 downregulated (*ALOX15*, *CHI3L1*, *CPA3*, *CTSG*, *IL1R2*, *IL8*, *NFKB1Z*, *PI3*, *SVIL*, and *TNF*) in AA subjects. *CHI3L1*, *CPA3*, *CTSG*, and *PI3* were extremely downregulated in AA subjects ($RQ > 10$) (Table 2, Baos et al., submitted).

3.3. Gene expression analyses according to severity

In the groups containing asthmatic subjects (allergic and non-allergic), which were composed of 50% severe asthmatic patients and 50% moderate-mild asthmatic subjects, we analyzed the relationship between severity and gene expression.

Firstly, the 2 subgroups classified according to severity within the same clinical group (NA or AA) did not show any statistically significant results. However, the gene-expression comparisons of these severity subgroups against the HC group revealed interesting data (Table 5). Five genes (*IL10*, *MSR1*, *PHLDA1*, *SERPINB2*, and *CD86*) were overexpressed and 4 genes (*CHI3L1*, *CPA3*, *IL8*, and *PI3*) were underexpressed in severe NA patients compared with controls (Table 5A). Thirty-three genes were underexpressed in severe

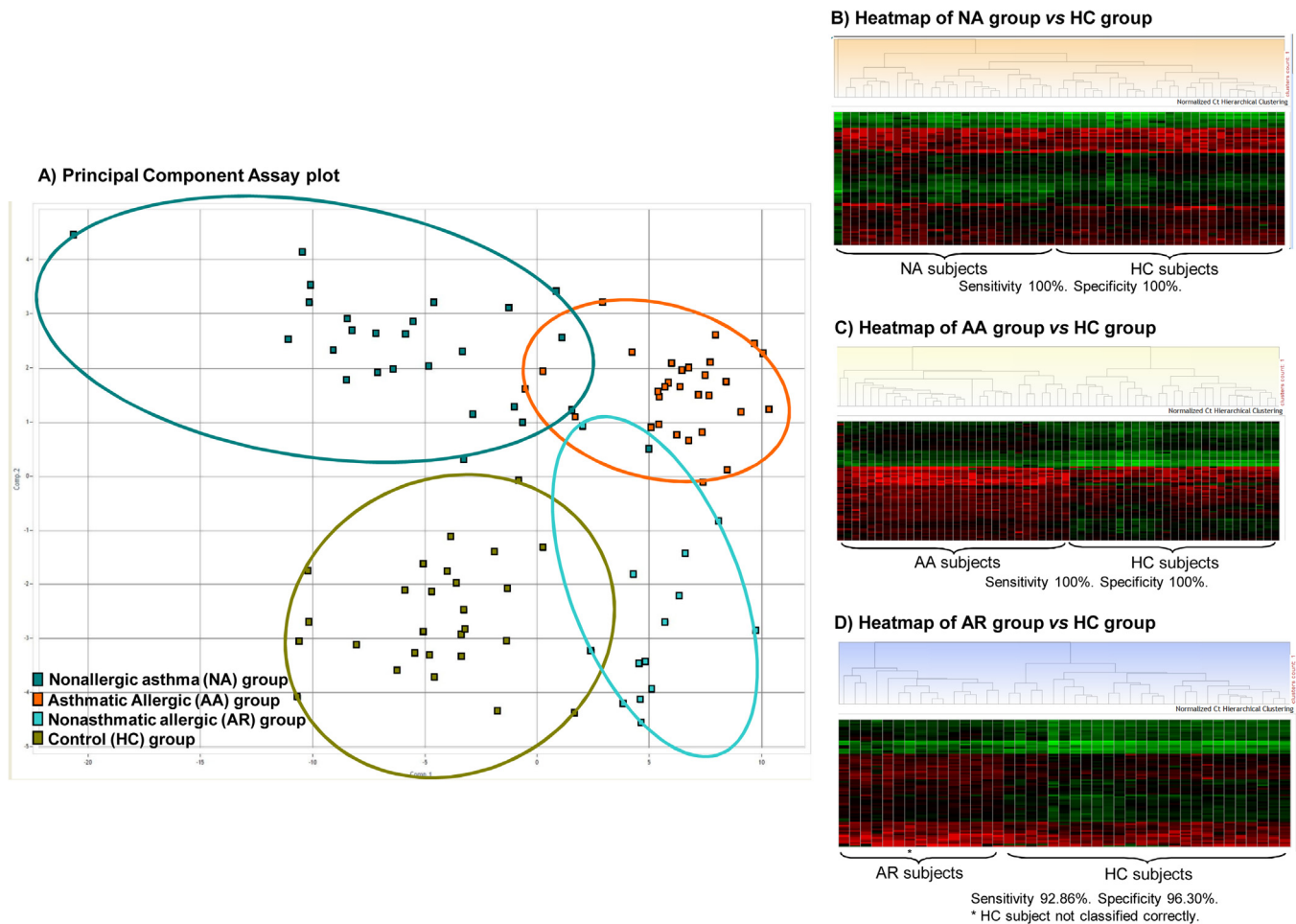


Fig. 1. Principal component assay plot and heatmaps of the four studied groups. a) Principal component assay plot; b) Heatmap of NA group vs HC group. Sensitivity 100%, specificity 100%; c) Heatmap of AA group vs HC group. Sensitivity 100%, specificity 100%; and d) Heatmap of AR group vs HC group. Sensitivity 92.86%, specificity 96.30%. * Control subject not classified correctly.

Table 2

Functional annotation clustering of the 26 significant genes of the nonallergic asthma (NA) group.

EXTRACELLULAR REGION	E.S: 3.73	CRATP, CHI3L1 , GPX3, IL10 , IL8 , LGALS3, MSR1 , PI3 , SERPINB2 , TNF, VCAN
EXTRACELLULAR MATRIX E.S: 2.64		CRTAP, CHI3L1 , LGALS3, PI3 , VCAN.
CELL SURFACE E.S: 2.31		CD86 , ILR2B, SELL, TLR4, TNF.
INFLAMMATORY PROCESSES	Cell activation	CD86 , IL10 , IL8 , TNF, ZAP70, TLR4.
E.S: 2.10	Inflammatory response	NLRP3, IL10 , IL8 , NFKBIZ, TLR4, TNF
	Extracellular space	CHI3L1 , GPX3, IL10 , IL8 , MSR1 , SERPINB2 , TNF
	Leukocyte activation	CD86 , IL10 , IL8 , ZAP70, TLR4
	Defense response	NLRP3, IL10 , IL8 , NFKBIZ, TNF, TLR4
	Leukocyte migration	IL10 , IL8 , TNF
	Cytokine-cytokine receptor interaction	IL1R2, IL10 , IL2RB, IL8 , TNF
IMMUNITY PROCESSES	Response to wounding	NLRP3, IL10 , IL8 , NFKBIZ, SERPINB2 , TNF, VCAN, TLR4
E.S: 1.94	Immune response	CD86 , NLRP3, IL1R2, IL10 , IL8 , TNF, ZAP70, TLR4
	Regulation of cytokine production	CD86 , NLRP3, IL10 , TNF, TLR4
	Regulation of apoptosis	NLRP3, EIF5A, IL10 , IL2RB, PHLDA1 , SERPINB2 , TNF, TLR4
OTHERS		CPA3 , FPR3, NFATC1, PTGR2, SVIL

E.S: Enrichment score. Genes associated with asthma severity appear in bold.

AA patients compared with controls (Table 5B), and the same 4 underexpressed genes in severe NA patients were highly underexpressed in severe AA patients. *MSR1* and *SERPINB2* were the only genes with statistically significant overexpression, though their increase was lower than the strict criteria established. It should be noted the high number of differential genes underexpressed in severe AA patients. This data should be analyzed in depth.

The unsupervised hierarchical model comparing samples classified according to severity vs HCs was able to cluster the samples

according to gene expression, doing so with 100% specificity and sensitivity for the severe NA group. The sensitivity and specificity for the discrimination of severe AA vs HC samples were slightly lower, at 86.67% and 92.5%, respectively (data not shown).

3.4. Highest levels of IL-8 in nonallergic asthmatic subjects

As the IL-8 cytokine seems to be one of the central differential proteins, levels of this cytokine were measured in the sera of

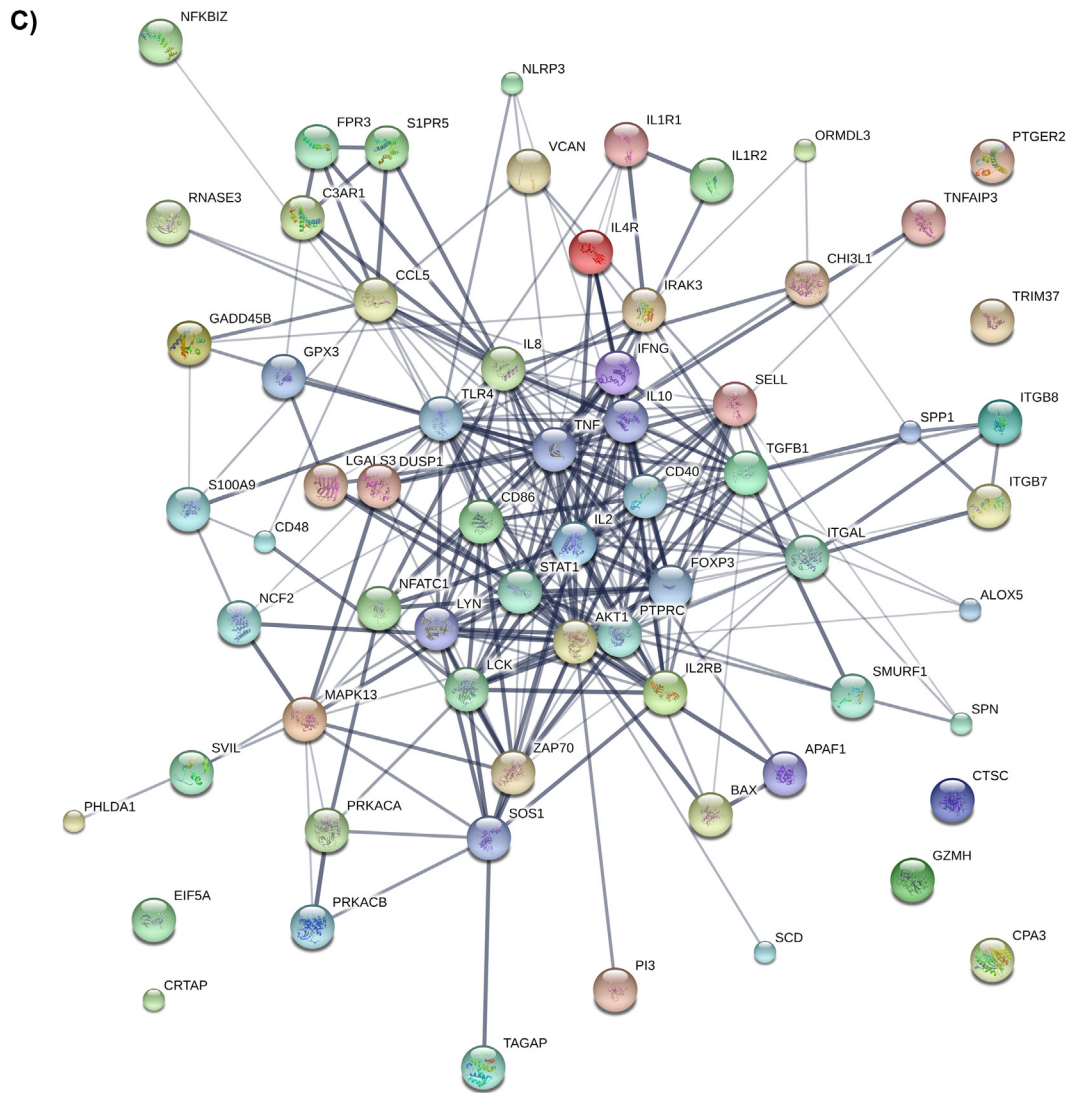


Fig. 2. (Continued)

HC, NA, and AA subjects. Mean sera levels expressed as pg/ml are summarized in Fig. 3A. The highest mean sera levels were found in NA patients (452.28 ± 357) followed by AA patients (327.46 ± 377), and the lowest levels were detected in HCs (286.09 ± 179), but these differences were not statistically significant. There was a high percentage of subjects with undetectable levels of IL-8 in the 3 groups (53.3%, 61.9%, and 71.4% in NA, AA, and HC, respectively). Analyses of IL-8 levels according to severity showed slight but non-significant differences between severe NA patients (505.49 ± 387.8) and moderate-mild NA patients (377.7 ± 338.27) (Fig. 3A). Though not significant, the highest differences were observed in IL-8 levels of severe AA patients (468.63 ± 423) compared with moderate-mild AA patients (92.5 ± 79.6).

3.5. MSR1 protein quantification

MSR1, macrophage scavenger receptor type 1, was the most highly overexpressed gene in NA subjects, mainly in severe asthmatic patients. For this reason and in order to correlate gene expression with MSR1 protein expression, Western blot was used in the total protein extracted from PBMCs from 9 control subjects and 18 NA patients (8 severe NA and 10 moderate-mild NA patients). Fig. 3B shows a representative example of the results of Western

blotting, revealing the presence of 2 main bands—one upper band (approx. 100 KDa) with a molecular weight (MW) near 113 KDa, and a lower band (approx. 70KDa) near 72.7 KDa. The relative quantification of these 2 bands with respect to β -actin showed a distinct distribution by groups; these differences were statistically significant in the lower protein band, which was more highly expressed in HCs than in NA subjects, but without differences according to severity.

4. Discussion

Chronic inflammatory diseases, including allergies and asthma, are the result of complex gene–environment interactions. A growing number of investigational therapeutics for asthma are biologic therapies that specifically target mediators of Th2 inflammation (Arron et al., 2013). However, mounting evidence has shown the high heterogeneity of asthma, which is why endotype-driven strategies are emerging of late. To become clinically relevant, the endotype should aim to validate biomarkers that correspond to the underlying mechanism (Agache et al., 2015). This information needs to be contrasted and validated in samples that can be easily processed. Interestingly, common patterns of gene expression have recently been described in the sputum and blood of children

Table 3
Functional annotation clustering of the 69 significant genes of the allergic asthma (AA) group.

INFLAMMATORY PROCESSES E.S: 11.38	Defense response	CD40, CD48, NLRP3, S100A9, APAF1, ALOX15, ALOX5, CTSG, CCL5, CX3CR1, C3AR1, ITGAL, IFNG, IL1R1, IL8, NCF2, NFKBIZ, PTPRC, RNASE3, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Inflammatory response	CD40, NLRP3, S100A9, ALOX15, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IL8, NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Response to wounding	BAX, CD40, NLRP3, S100A9, ALOX15, ALOX5, CCL5, CX3CR1, C3AR1, ITGAL, IL8, NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN, VCAN
UPREGULATION OF MACROMOLECULE METABOLIC PROCESSES E.S: 5.56 UPREGULATION OF IMMUNE SYSTEM PROCESS E.S: 4.93 REGULATION OF APOPTOSIS E.S: 4.65 PROCESSES OF RESPONSE E.S: 4.47	Upregulation of multicellular organismal process	BAX, CD40, NLRP3, ADRB1, ALOX5, CCL5, IFNG, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1
	Response to organic substance	CD40, CD86, SMURF1, EIF5A, FOXP3, IFNG, IL2, IL2RB, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Response to hormone stimulus Phosphorus metabolism	CD40, CD86, C3AR1, IFNG, IL2, IL4R, IRAK3, LCK, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, LYN, ZAP70 BAX, NLRP3, APAF1, DUSP1, EIF5A, IFNG, IL2, IL2RB, LCK, PTPRC, SPN, STAT1, SOS1, TLR4, TGFB1, TNF, TNFAIP3, AKT1 CD48, CTSC, CCL5, DUSP1, IFNG, IL1R1, IRAK3, PRKACA, PRKACB, SPP1, SELL, STAT1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN CCL5, DUSP1, PRKACA, PRKACB, SPP1, STAT1, TGFB1, TNF, AKT1, LYN DUSP1, GADD45B, IFNG, IRAK3, LCK, MAPK13, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TGFB1, TNF, AKT1, LYN, ZAP70
REGULATION OF PROTEIN PROCESSES E.S: 4.34	Regulation of production of molecular mediator of immune response	CD40, FOXP3, IFNG, IL2, IRAK3, PTPRC, TGFB1, TNF
	Regulation of protein modification processes	BAX, SMURF1, FOXP3, IFNG, IL2, PTPRC, TLR4, TGFB1, TNF, LYN
	Protein regulation of transport	BAX, NLRP3, IFNG, IL2, PRKACA, TGFB1, TNF, AKT1 FOXP3, IL2, IRAK3, PTPRC, SPP1, SPN, TGFB1, AKT1
NEGATIVE REGULATION OF RESPONSE TO STIMULUS E.S: 3.32 CHEMOTAXIS PROCESSES E.S: 3.22 IMMUNE PROCESSES E.S: 3.14	Chemotaxis	S100A9, CCL5, CX3CR1, C3AR1, FPR3, IFNG, IL8, SPN
	Leukocyte migration	S100A9, CCL5, IFNG, IL8, TNF
	Leukocyte chemotaxis	S100A9, CCL5, IFNG, IL8
	Leukocyte activation	BAX, CD40, CD48, CD86, FOXP3, ITGAL, IL2, IL8, LCK, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, LYN, ZAP70 CD40, CD86, FOXP3, IFNG, IL2, IL4R, PTPRC, SPN, TGFB1
	Regulation of adaptive immune responses	BAX, CD48, CD86, FOXP3, ITGAL, IL2, LCK, PTPRC, SPN, TGFB1, ZAP70 CD40, FOXP3, IFNG, IL2, IRAK3, PTPRC, SPN, TGFB1, TNF
	T-cell activation	CD40, IFNG, IL2, PTPRC, TGFB1
	Regulation of immune effector processes	CD40, IFNG, IL2, PTPRC, TGFB1, TNF
	Upregulation of isotype switching	CD40, FOXP3, IFNG, IL2, PTPRC, SPN, TGFB1, ZAP70
	Regulation of immunoglobulin production	CD40, CD86, NLRP3, FOXP3, IFNG, IRAK3, SPN, TLR4, TGFB1, TNF
	Regulation of leukocyte proliferation	CTSG, CCL5, IFNG, IRAK3, RNASE3, SPN, STAT1, TLR4, TNF
	Regulation of cytokine production	NLRP3, CCL5, IFNG, IRAK3, PTPRC, STAT1, TNF
	Response to bacterium	BAX, IL2, LCK, PTPRC, SPN, TGFB1, TNF, LYN, ZAP70 CD40, IFNG, IL2, PTPRC, TGFB1
REGULATION OF RESPONSE TO EXTERNAL STIMULUS E.S: 2.64 CELL ADHESION E.S: 2.29 EXTRACELLULAR MATRIX E.S: 1.91 OTHERS	Response to virus	CCL5, IL2, IL8, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1
	Immune system development	CCL5, CX3CR1, ITGAL, ITGB7, ITGB8, IL2, PTPRC, SPP1, SELL, TNF, VCAN
	Regulation of B cell activation	CRTAP, CHI3L1, LGALS3, PI3, SPN, TGFB1, VCAN
		CPA3, GPX3, GZMH, IL1R2, MSR1, NFATC1, ORMDL3, PTGER2, S1PR5, SCD, SVIL, TAGAP, TRIM37

E.S: Enrichment score. Genes associated with asthma severity appear in bold.

and adults that were associated with near-fatal, severe, and milder asthma (Yan et al., 2015). Seeking to validate some of these previous results in samples obtained using non-invasive methods; we selected 94 genes (Table 1, Baos et al., submitted) from possible biomarkers previously described in different tissues and cell types, studying these genes in PBMCs from subjects with 4 clinical phenotypes (Table 1). The final purpose of this work was to introduce new diagnostic or prognostic tools for asthma and allergic phenotypes that can be easily analyzed.

Global gene-expression analysis carried out using PCA (unsupervised method) (Fig. 1A) showed the clustering of the 4 clinical groups according to the 94 genes. More specifically, two-by-two comparisons by hierarchical unsupervised analyses were able to

differentiate asthmatic samples (allergic or nonallergic) from HCs (Fig. 1B and C) in all cases. These results indicate that gene selection was appropriate and raise the possibility of finding specific gene biomarkers for the different clinical phenotypes at a peripheral level.

Despite the limited number of samples, specific differential gene expression and functional analyses comparing clinical groups revealed many statistically significant results. Functional analyses of these genes and the network of protein interactions (Tables 2, 3, and 4 and Fig. 2) showed the high complexity of protein interactions and a higher enrichment score in allergic conditions (asthmatic and nonasthmatic) than in NA subjects, where IL-8 and TNF seem to be a core of these interactions.

Table 4

Functional annotation clustering of the 66 significant genes of the nonasthmatic allergy (AR) group.

INFLAMMATORY PROCESSES E.S: 10.65	Defense response	CD40, CD48, NLRP3, S100A9, APAF1, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IFNG, IL1R1, IL10, IL8, NCF2, NFKBIZ, PTPRC, RNASE3, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Inflammatory response	CD40, NLRP3, S100A9, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IL10, IL8, NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Response to wounding	BAX, CD40, NLRP3, S100A9, ALOX5, CCL5, C3AR1, ITGAL, IL10, IL8, NFKBIZ, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN, VCAN
PROCESSES OF RESPONSE E.S: 5.98	Up-regulation of multicellular organismal process	BAX, CD40, NLRP3, ALOX5, CCL5, IFNG, SPP1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1
	Response to organic substance	CD48, CTSC, CCL5, DUSP1, IFNG, IL1R1, IL10, IRAK3, PRKACA, PRKACB, SPP1, SELL, STAT1, TLR4, TGB1, TNF, AKT1, LYN
	Response to hormone stimulus	CCL5, DUSP1, IL10, PRKACA, PRKACB, SPP1, STAT1, TGB1, TNF, AKT1, LYN
REGULATION OF APOPTOSIS E.S: 5.25	Regulation of leukocyte mediated immunity	BAX, NLRP3, APAF1, DUSP1, EIF5A, IFNG, IL10, IL2, IL2RB, LCK, PHLDA1, PTPRC, SPN, STAT1, SOS1, TLR4, TGFB1, TNF, TNFAIP3, AKT1
	Regulation of T-cell proliferation	CD40, FOXP3, IFNG, IL10, IL2, IL2RB, PTPRC, SPN, TGFB1
	Down-regulation of the immune system process	FOXP3, IFNG, IL10, IL2, PTPRC, SPN, TGFB1, ZAP70
SIGNALING I E.S: 4.42	Positive regulation of molecular function	FOXP3, IL10, IL2, IL4R, IRAK3, PTPRC, SPN, TGFB1
	Positive regulation of catalytic activity	BAX, NLRP3, APAF1, GADD45B, IFNG, IL10, IL2, IRAK3, LCK, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1
	Protein kinase cascade	BAX, NLRP3, APAF1, GADD45B, IFNG, IL2, LCK, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1
SIGNALING II E.S: 4.38	Regulation of phosphorylation	GADD45B, IFNG, IL10, MAPK13, PRKACA, PRKACB, PTPRC, STAT1, TLR4, TNF, AKT1, ZAP70
	Immune response-regulating signal transduction	BAX, GADD45B, IFNG, IL2, IRAK13, PRKACA, PRKACB, PTPRC, TLR4, TGFB1, TNF, AKT1, LYN
	Activation of immune response	CD40, C3AR1, IRAK3, PTPRC, TLR4, LYN, ZAP70
REGULATION OF IMMUNE PROCESSES II E.S: 3.48	Leukocyte activation	BAX, CD40, CD48, CD86, FOXP3, ITGAL, IL10, IL2, IL8, LCK, PTPRC, SPN, TLR4, TGFB1, LYN, ZAP70
	Regulation of adaptive immune response	CD40, CD86, FOXP3, IFNG, IL10, IL2, IL4R, PTPRC, SPN, TGFB1
	Regulation of production of molecular mediator of immune response	CD40, FOXP3, IFNG, IL10, IL2, IRAK3, PTPRC, TGFB1, TNF
REGULATION OF RESPONSE TO EXTERNAL STIMULUS E.S: 3.06	Regulation of immune effector process	CD40, FOXP3, IFNG, IL10, IL2, IRAK3, PTPRC, SPN, TGFB1, TNF
	Regulation of isotype switching	CD40, IFNG, IL10, IL2, PTPRC, TGFB1
	Regulation of leukocyte proliferation	CD40, FOXP3, IFNG, IL10, IL2, PTPRC, SPN, TGFB1, ZAP70
CELL ADHESION E.S: 2.21	Regulation of cytokine production	CD40, CD86, NLRP3, FOXP3, IFNG, IL10, IRAK3, SPN, TLR4, TGFB1, TNF
	Regulation of B-cell-mediated immunity	CD40, IFNG, IL10, IL2, PTPRC, TGFB1
	Response to bacterium	CCL5, IFNG, IL10, IRAK3, RNASE3, SPN, STAT1, TLR4, TNF
EXTRACELLULAR MATRIX E.S: 2.00	Immune system development	BAX, IL10, IL2, LCK, PTPRC, SPN, TGFB1, TNF, LYN, ZAP70
	Leukocyte migration	S100A9, CCL5, IFNG, IL10, IL8, TNF
	Chemotaxis	S100A9, CCL5, C3AR1, FPR3, IFNG, IL10, IL8, SPN
OTHERS	Regulation of inflammatory response	CCL5, IL10, IL2, SPN, TLR4
		CCL5, IL10, IL2, IL8, SPP1, SPN, TLR4, TGFB1
		CCL5, ITGAL, ITGB7, ITGB8, IL2, PTPRC, SPP1, SELL, TNF, VCAN
OTHERS		CRTPA, CH13L1, LGALS3, PI3, SPN, TGFB1, VCAN
		CPA3, GPX3, GZMH, IL1R2, NFATC1, ORMDL3, PTGER2, RNASE3, S1PR5, SVIL, TAGAP, TRIM37

E.S: Enrichment score.

Taking into account all the comparisons, there was a group of specific genes that seemed to be in especially close relation with each clinical condition. (Table 2, Baos et al., submitted).

Analyses according to disease severity in asthmatic subject groups showed that *IL10*, *MSR1*, *PHLDA1*, *SERPINB2*, and *CD86* were overexpressed, and *CHI3L1*, *CPA3*, *IL8*, and *PI3* (Table 5A) were underexpressed in severe NA patients compared with HC subjects. In severe AA patients, 33 genes were underexpressed compared with HC subjects (Table 5B), sharing the same 4 underexpressed genes as in severe NA. *MSR1* and *SERPINB2* were the only statistically significant overexpressed genes, but their increase was lower than the strict criteria established ($RQ < 4$).

Recently, genomic studies of asthma have been reviewed (Sircar et al., 2014), and several genes such as chemokine ligands (*CCL8*, *CCL5*, *CCL11*, and *CCL24*), SERPINS (*SERPINB2*, *SERPINB4*, and *SERPINA1*), and carboxypeptidase A3 (*CPA3*) have been defined as potential asthma biomarkers. In this study, *CCL5*, *CCL11*, *SERPINB2*, *SERPINB4*, and *CPA3* were some of the genes analyzed, although *CCL11* and *SERPINB4* were unable to be assessed. However, *CCL5* has been confirmed as a possible biomarker capable of differentiating allergy conditions from NA (Table 2, Baos et al., submitted). *CCL5* or *RANTES*, is a member of the CC subfamily of chemokine genes.

It functions as a chemoattractant for blood monocytes, memory T-helper cells, and eosinophils, and it causes the release of histamine from basophils and activates eosinophils. In accordance with our results, individuals with NA were described as having higher expression of *RANTES* in mucosa and bronchoalveolar lavage fluid (Humbert et al., 1997). Also, several *CCL5* polymorphisms have recently been reviewed and associated with asthma risk (Huang et al., 2015).

SERPINS are members of the serine protease inhibitor family; these inhibit neutrophil protease cathepsin G and mast-cell chymase and protect the lower respiratory tract from damage by proteolytic enzymes. *SERPINB2* has been detected in different kinds of cells, playing a role in inflammation and remodeling (Swartz et al., 2004). Indeed, the regulation of Th1 responses was described as a physiological function of inflammation associated with *SERPINB2* (Schroder et al., 2010). It was later reported that *SERPINB2* was specifically upregulated by IL-13 in airway epithelial cells (Woodruff et al., 2009; Peters et al., 2014) and their expression profile (together with periostin or *POSTN* and *CLCA1*) allowed the classification of asthma as Th2-high or

–low (Woodruff et al., 2009). However, a recent study failed to confirm *SERPINB2* gene expression as being differentially expressed

Table 5

Genes differentially expressed according to severity in asthma groups. A. Nonallergic asthma (NA) group. B. Allergic asthma (AA) group.

Gene	Expression	NA vs Control		Severe NA vs Control		Moderate-Mild NA vs Control	
		RQ	adjusted <i>P</i>	RQ	adjusted <i>P</i>	RQ	adjusted <i>P</i>
<i>CD86</i>	Higher	3.197	6.80E-05	4.853	4.12E-06	2.106	3.10E-02
<i>IL10</i>	Higher	6.142	1.62E-06	7.865	1.07E-06	4.796	1.74E-03
<i>MSR1</i>	Higher	12.891	1.44E-06	25.719	4.66E-07	6.461	3.41E-03
<i>PHLDA1</i>	Higher	6.899	1.86E-06	10.531	1.38E-07	4.520	1.72E-03
<i>SERPINB2</i>	Higher	8.948	7.61E-05	10.929	5.53E-04	7.326	3.46E-03
<i>CHI3L1</i>	Lower	0.027	3.20E-14	0.021	9.73E-12	0.034	2.39E-10
<i>CPA3</i>	Lower	0.222	1.07E-03	0.304	2.72E-02	0.162	2.61E-03
<i>IL8</i>	Lower	0.128	3.22E-08	0.151	7.90E-05	0.108	1.37E-06
<i>PI3</i>	Lower	0.006	4.61E-16	0.005	4.79E-12	0.007	9.47E-12

Gene	Expression	AA vs Control		Severe AA vs Control		Moderate-Mild AA vs Control	
		RQ	adjusted <i>P</i>	RQ	adjusted <i>P</i>	RQ	adjusted <i>P</i>
<i>ALOX15</i>	Lower	0.050	4.00E-09	0.040	4.57E-07	0.064	1.49E-05
<i>ALOX5</i>	Lower	0.235	6.14E-08	0.226	1.81E-05	0.244	7.63E-06
<i>APAF1</i>	Lower	0.141	6.31E-13	0.150	9.65E-09	0.132	2.22E-09
<i>C3AR1</i>	Lower	0.162	8.65E-09	0.149	4.31E-06	0.175	7.03E-08
<i>CCL5</i>	Lower	0.141	3.18E-12	0.139	1.62E-08	0.144	5.51E-11
<i>CHI3L1</i>	Lower	0.003	6.18E-22	0.003	3.39E-17	0.002	1.01E-17
<i>CPA3</i>	Lower	0.028	8.47E-13	0.033	4.28E-09	0.023	8.20E-10
<i>CRTAP</i>	Lower	0.193	1.16E-13	0.208	3.48E-09	0.180	8.00E-12
<i>CTSG</i>	Lower	0.043	1.53E-10	0.040	4.88E-08	0.046	8.30E-08
<i>DUSP1</i>	Lower	0.127	9.91E-16	0.126	1.22E-10	0.127	1.79E-10
<i>GADD45B</i>	Lower	0.116	9.55E-17	0.118	3.71E-11	0.113	1.15E-11
<i>GZMH</i>	Lower	0.151	1.46E-12	0.131	4.87E-09	0.174	2.04E-09
<i>IFNG</i>	Lower	0.089	1.37E-12	0.086	1.43E-10	0.093	6.06E-09
<i>IL1R2</i>	Lower	0.021	6.23E-18	0.030	4.28E-13	0.015	3.36E-14
<i>IL4R</i>	Lower	0.189	2.41E-13	0.189	1.34E-08	0.189	1.05E-10
<i>IL8</i>	Lower	0.026	3.38E-19	0.031	5.72E-12	0.022	1.33E-14
<i>LYN</i>	Lower	0.126	2.04E-18	0.135	4.51E-12	0.117	5.67E-13
<i>NCF2</i>	Lower	0.132	2.20E-11	0.135	2.45E-07	0.129	6.12E-10
<i>NFKBIZ</i>	Lower	0.106	6.98E-19	0.100	1.74E-13	0.112	4.05E-12
<i>PI3</i>	Lower	0.001	2.71E-24	0.001	7.17E-19	0.001	1.01E-17
<i>PRKACA</i>	Lower	0.202	4.23E-13	0.217	1.10E-08	0.188	2.49E-10
<i>PTPRC</i>	Lower	0.136	1.06E-09	0.104	2.37E-07	0.179	3.16E-07
<i>S100A9</i>	Lower	0.087	1.52E-15	0.085	1.22E-10	0.090	1.38E-11
<i>SELL</i>	Lower	0.110	3.24E-15	0.088	5.26E-11	0.137	8.72E-11
<i>SOS1</i>	Lower	0.166	9.76E-10	0.198	8.84E-06	0.139	1.67E-07
<i>SPN</i>	Lower	0.191	1.30E-13	0.170	1.09E-09	0.214	5.77E-10
<i>STAT1</i>	Lower	0.147	7.39E-16	0.154	1.43E-10	0.141	5.51E-11
<i>SVIL</i>	Lower	0.079	7.83E-19	0.089	4.43E-13	0.069	8.21E-13
<i>TAGAP</i>	Lower	0.092	3.38E-19	0.110	4.62E-12	0.077	1.18E-14
<i>TGFB1</i>	Lower	0.181	4.71E-20	0.199	4.28E-13	0.164	1.18E-14
<i>TLR4</i>	Lower	0.087	1.16E-13	0.113	2.30E-08	0.068	1.38E-11
<i>TNF</i>	Lower	0.067	3.47E-21	0.069	1.52E-15	0.065	3.97E-14
<i>TNFAIP3</i>	Lower	0.100	2.80E-19	0.103	1.39E-13	0.098	5.96E-13

Genes with a RQ (relative quantification) lower than 0.25 in the three comparisons performed. Genes shared with NA group appear in bold.

in sputum cells from asthmatic patients (Peters et al., 2014). Here, *POSTN* and *CLCA1* were undetectable, but *SERPINB2* was strongly increased and associated with the asthma condition, mainly in severe NA, confirming it is a good biomarker candidate for severe asthma in PBMCs.

Carboxypeptidase A3 (*CPA3*) is a protease predominantly found in the mast-cell granule that was found to be upregulated in lung epithelium and in sputum cell pellets from patients with Th2-high asthma (Woodruff et al., 2009; Peters et al., 2014). Interestingly, this gene was highly underexpressed at the peripheral level in our study, and was associated with asthma severity in AA and NA and was one of the most differential genes between the AA and AR groups.

Another 3 genes that were positively associated with asthma severity in NA patients were *PHLDA1*, *CD86*, and *IL-10*. *PHLDA1* (pleckstrin homology-like domain, family A, member 1) is a gene that encodes a proline-histidine-rich nuclear protein and has been described as a putative epithelial stem-cell marker in the human small and large intestine (Sakthianandeswaren et al., 2011). *CD86* is a member of the immunoglobulin superfamily and encodes a type

I membrane protein. It is expressed by antigen-presenting cells, and it is the ligand for 2 T-cell surface proteins, the CD28 antigen (costimulatory signal for activation) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) (negative regulator of the immune response) (Lichtenegger et al., 2012). *IL-10* is a cytokine produced primarily by monocytes and, to a lesser extent, by lymphocytes. It has pleiotropic effects and, together with TGF- β , is considered to be the main regulatory cytokine. It has been extensively related with asthma and allergy diseases (Palomares et al., 2014). Recently, the role of these 2 cytokines in different diseases has been reviewed (Mingomataj and Bakiri, 2016) and they have been described as a potential switch of immunity response, indicating that *IL-10* is mainly produced during transient immune conditions. In the present study, *IL-10* was highly overexpressed in NA compared to the HC group, mainly in severe patients but also in asthmatic (allergic or nonallergic) compared with allergic nonasthmatic subjects. *IL-10* seems to be an interesting potential biomarker of asthma severity.

MSR1 was found to be the most overexpressed gene in severe asthma conditions. This gene encodes the class A macrophage

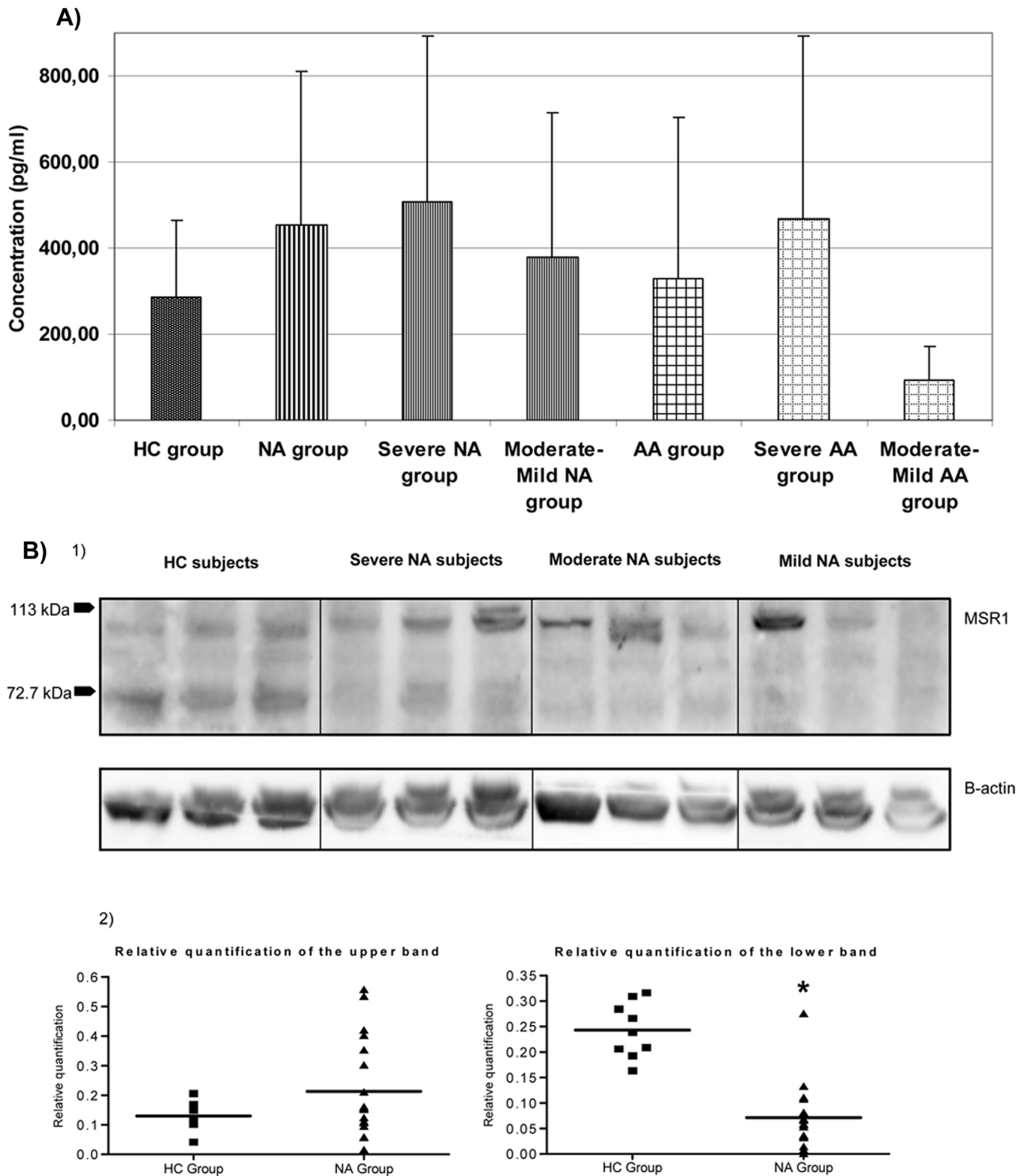


Fig. 3. A Mean levels of IL-8 in serum of the HC, NA and AA groups, and 3B: MSR1 determination. 1) Representative example of MSR1 expression by Western blot in 3 HCs, 3 severe, 3 moderate, and 3 mild NA subjects; and 2) Relative quantification of the 2 bands detected by the MSR1 antibody of all the subjects studied (9 HC, 8 severe NA, 10 moderate-mild NA). *Statistically significant comparison ($P < 0.001$) between NA and HC group.

scavenger receptors, also called SR-A or CD204. These receptors are macrophage-specific trimeric integral membrane glycoproteins and have been implicated in many macrophage-associated physiological and pathological processes. Although MSR1 was considered a macrophage-specific receptor because it was predominantly

found on macrophages (Naito et al., 1991), it has been further described in several other types of cells such as vascular smooth muscle cells, endothelial cells (EC), human lung epithelial cells, etc. (Tomokiyo et al., 2002). This fact increases the pathophysiologic importance of this receptor, pointing to a pivotal role in

health and disease (Kelley et al., 2014). Interestingly, several studies have associated high MSR1 expression with COPD (Thomsen et al., 2011; Ohar et al., 2010), and mechanisms leading to accumulation of macrophages with this marker in the lung could contribute to severe emphysema and COPD (Kaku et al., 2014). This protein has rarely been described in peripheral samples (Nakayama et al., 2008; Piechota et al., 2012).

In this study, MSR1 was selected to validate our previous results (Aguerre et al., 2013) of overexpression in the PBMCs of AA patients compared with HCs. Interestingly, this gene is one of the most differential in asthma disease and here we have also found evidence of its relevance in the severity of NA (Table 5A). The MSR1 protein expression in the total of protein extracted from PBMCs (Fig. 3B) showed that the human antibody against MSR1 recognized a different protein profile in HCs than in NA patients (Fig. 3B). These data confirm the proteic expression of MSR1 in PBMCs and point to interesting differences between healthy and asthmatic subjects that should be researched in depth.

Although a more exhaustive analysis of the peripheral expression of MSR1 could be interesting, taking these data together with data previously published for COPD (Thomsen et al., 2011; Ohar et al., 2010; Kaku et al., 2014) makes MSR1 a very good biomarker candidate for severity in several respiratory diseases.

Another 3 genes were found to be extremely downregulated in severe NA subjects: *CHI3L1*, *PI3*, and *IL8*. *CHI3L1* (chitinase 3-like 1) encodes a glycoprotein member of the glycosyl hydrolase 18 family or YKL-40. This protein lacks chitinase activity and is secreted by activated macrophages, chondrocytes, neutrophils, and synovial cells. It is thought to play a role in the process of inflammation and tissue remodeling (Lee et al., 2011), and its role as a versatile biomarker has been reviewed in YKL-40-regulated signaling mechanisms (Prakash et al., 2013). Its increase in the serum of asthmatic patients has been demonstrated (Chupp et al., 2007), and its levels have been correlated with disease severity (Ober et al., 2008; Konradsen et al., 2013). Specifically, it has been suggested that chitinase family members may be involved in the development of fibrosis and airway remodeling (Ober et al., 2008).

PI3 (peptidase inhibitor 3 skin-derived) encodes an elastase-specific inhibitor (Trappin-2 or Elafin) that functions as an antimicrobial peptide. This protein is a potent serine protease inhibitor that prevents excessive damage in different inflammatory states. It is locally expressed by epithelial cells and immune cells such as macrophages and γ T cells. Further, it has been proven to modulate a wide range of parameters that are critical for the inflammation process but having pleiotropic effects (Verrier et al., 2012).

The *IL8* gene encodes interleukin 8, a member of the CXC chemokine family and one of the major mediators of the inflammatory response and very important for many neutrophil functions, including chemotaxis and survival. It is secreted by several cell types. This gene is believed to play a role in the pathogenesis of bronchiolitis, a common respiratory disease caused by viral infection and which plays a significant role in the development of acute lung injury by, among other possible mechanisms, effecting neutrophil apoptosis (Allen and Kurdowska, 2014). Circulating levels of IL-8 can also stimulate the release of neutrophils into circulation, and it has been described that in noneosinophilic asthma, blood neutrophils release significantly higher levels of interleukin-8 than eosinophilic asthma and HCs (Baines et al., 2010). Interestingly, by investigating the interaction of airway epithelium and smooth muscles, it was described that YKL-40 could be involved in the inflammation of asthma by induction of IL-8 from epithelium (Tang et al., 2013).

All of these data—together with the fact that the IL-8 cytokine seems to be one of the central differential proteins in our study (Fig. 2), and that it is associated with severity in the asthma group

(Table 5A)—led us to analyze its protein expression level. Fig. 3A shows the IL-8 mean sera levels in the HC, NA, and AA groups. Although there were no statistically significant differences—likely due to the small size of the population—the highest IL-8 levels were found in NA. These data are in agreement with the idea that many of the NA subjects and some of the most severe forms of asthma could be due to an increase of neutrophils, which could explain the high level of IL-8. We observed a higher number and percentage of eosinophils in severe AA than in severe NA (data not shown), although we lack data on neutrophils. According with this idea, in this study we found high levels of IL8 protein in sera of severe NA. The fact that there is an inverse correlation between gene expression and protein levels could be due to the different samples used to measure them (PBMCs and sera).

Another gene related with neutrophils was extremely downregulated in AA patients, namely, *CTGS* (Table 2, Baos et al., submitted). This gene encodes cathepsin G, a member of the peptidase S1 protein family that is found in azurophilic granules of neutrophils. It has been studied and described as being differentially expressed in the neutrophilic asthma phenotype relative to eosinophilic asthma (Baines et al., 2011).

5. Conclusions

In conclusion, using peripheral samples, we have confirmed several gene profiles that could be very useful for characterizing different asthma-allergic phenotypes. Additionally, we have described new potential biomarkers of severity in asthma. These data could be useful as biomarkers as well as new therapeutic and/or prognostic tools.

Author contribution statement

S. Baos, D. Calzada, and B. Cárda have worked on all project steps: design of the study, experimental work, discussion of results, and manuscript drafting.

L. Cremades collaborated in drafting the manuscript.

J. Sastre, J. Quiralte, and F. Florido performed patient selection and collaborated in the design of the study.

C. Lahoz has collaborated in the design of the study, results discussion, and manuscript drafting.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

Acknowledgments

This work was supported in part by research grant PI13/01730, co-supported by FEDER, CIBERES (ISCIII, 0013) and Biobank (PT13/0010/0012 from the Fund for Health Research (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness)). S. Baos was supported by CIBERES (ISCIII, 0013) and *Conchita Rábago* Foundation. D. Calzada by *Conchita Rábago* Foundation, Madrid, Spain. L. Cremades was supported by a contract from MINECO (PEJ-2014-A-31609, *Sistema de Garantía Juvenil*), cofinanced by the European Social Fund (ESF) and the Youth Employment Initiative (YEI). We are also grateful to Oliver Shaw for revising the manuscript for English usage and style.

References

- Agache, I., Sugita, K., Morita, H., Akdis, M., Akdis, C.A., 2015. The complex type 2 endotype in allergy and asthma: from laboratory to bedside. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 15, 29, <http://dx.doi.org/10.1007/s11882-015-0529-x>.
- Aguerre, M., Calzada, D., Montaner, D., Mata, M., Florido, F., Quiralte, J., 2013. Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 27, 337–350.

- Allen, T.C., Kurdowska, A., 2014. Interleukin 8 and acute lung injury. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 266–269.
- Anderson, G.P., 2008. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* 372, 1107–1119.
- Arron, J.R., Scheerens, H., Matthews, J.G., 2013. Redefining approaches to asthma developing targeted biologic therapies. *Adv. Pharmacol.* 66, 1–49.
- Baines, K.J., Simpson, J.L., Bowden, N.A., Scott, R.J., Gibson, P.G., 2010. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *Eur. Respir. J.* 35, 522–531.
- Baines, K.J., Simpson, J.L., Wood, L.G., Scott, R.J., Gibson, P.G., 2011. Systemic upregulation of neutrophil α -defensins and serine proteases in neutrophilic asthma. *Thorax* 66, 942–947.
- Baos, S., Calzada, D., Cremades, L., Sastre J., Quirarte, J., Florido F., Lahoz C., Cárda B. Data set on a study of gene expression in peripheral samples to identify biomarkers of severity of allergic and nonallergic asthma. Data in Brief. (Submitted).
- Chupp, G.L., Lee, C.G., Jarjour, N., 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.* 357, 2016–2027.
- D'Amato, G., Stanzola, A., Sanduzzi, A., et al., 2014. Treating severe allergic asthma with anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab): a review. *Multidiscip. Respir. Med.* 9, 23, <http://dx.doi.org/10.1186/2049-6958-9-23>.
- Faiz, A., Burgess, J.K., 2012. How can microarrays unlock asthma? *J. Allergy (Cairo)*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/241314>.
- Fajt, M.L., Wenzel, S.E., 2015. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 299–310.
- GEMA (Guía española del manejo del asma), 2009. *Arch. Bronconeumol.* 45, 2–35.
- George, B.J., Reif, D.M., Gallagher, J.E., et al., 2015. Data-Driven Asthma Endotypes defined from blood biomarker and gene expression data. *PLoS One*, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117445>.
- Holgate, S.T., 2012. Stratified approaches to the treatment of asthma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76, 277–291.
- Huang, H., Nie, W., Zang, Y., Chen, J., Xiu, Q., 2015. Association between CCMotif chemokine ligand 5 (CCL5) polymorphisms and asthma risk: an updated meta-analysis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 25, 26–33.
- Humbert, M., Ying, S., Corrigan, C., et al., 1997. Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5 granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16, 1–8.
- Kaku, Y., Imaoka, H., Morimatsu, Y., Komohara, Y., Ohnishi, K., Oda, H., et al., 2014. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087400>.
- Kelley, J.L., Ozment, T.R., Li, C., Schweitzer, J.B., Williams, D.L., 2014. Scavenger Receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 34, 241–261.
- Konradsen, J.R., James, A., Nordlund, B., Reinius, L., E. Söderhäll, C., Melén, E., et al., 2013. The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 328–335.
- Lee, C.G., Da Silva, C.A., De la Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.J., et al., 2011. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 479–501.
- Lichtenegger, F.S., Mueller, K., Otte, B., Beck, B., Hiddemann, W., Schendel, D.J., et al., 2012. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells. *PLoS One*, 70, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044266>.
- Mingomataj, E.Ç., Bakiri, A.H., 2016. Regulator versus effector paradigm: interleukin-10 as indicator of the switching response. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 50, 97–113.
- Mukherjee, A.B., Zhang, Z., 2011. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factor. *J. Biol. Chem.* 286, 32883–32889.
- Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T., Takahashi, K., 1991. Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine macrophage scavenger receptors. *Am. J. Pathol.* 139, 1411–1423.
- Nakayama, M., Kudoh, T., Kaikita, K., Yoshimura, M., Oshima, S., Miyamoto, Y., 2008. Class A macrophage scavenger receptor gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells specifically increase in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 198, 426–433.
- Ober, C., Tan, Z., Sun, Y., Possick, J.D., Pan, L., Nicolae, R., Radford, S., 2008. et al., Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL40 level, risk of asthma, and lung function. *N. Engl. J. Med.* 358, 1682–1691.
- Ohar, J.A., Hamilton Jr., R.F., Zheng, S., Sadeghnejad, A., Sterling, D.A., Xu, J., et al., 2010. COPD is associated with a macrophage scavenger receptor-1 gene sequence variation. *Chest* 137, 1098–1107.
- Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M., et al., 2014. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun.* 15, 511–520.
- Peters, M.C., Mekonnen, Z.K., Yuan, S., Bhakta, N.R., Woodruff, P.G., Fahy, J.V., 2014. Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 388–394.
- Piechota, M., Banaszewska, A., Dudziak, J., Slomczynski, M., Plewa, R., 2012. Highly upregulated expression of CD36 and MSR1 in circulating monocytes of patients with acute coronary syndromes. *Protein J.* 31, 511–518.
- Prakash, M., Bodas, M., Prakash, D., Nawani, N., Khetmalas, M., Mandal, A., et al., 2013. Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in 'outside-in' signaling. *Cell. Signal.* 25, 1567–1573.
- Sakthianandeswaren, A., Christie, M., D'Andreti, C., Tsui, C., Jorissen, R.N., Li, S., et al., 2011. PHLDA1 expression marks the putative epithelial stem cells and contributes to intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 71, 3709–3719.
- Schroder, W.A., Le, T.T., Major, L., Street, S., Gardner, J., Lambley, E., et al., 2010. A physiological function of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity. *J. Immunol.* 184, 2663–2670.
- Sircar, G., Saha, B., Bhattacharya, S.G., Saha, S., 2014. Allergic asthma biomarkers using systems approaches. *Front. Genet.* 4, 308, <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2013.00308>.
- Swartz, J.M., Byström, J., Dyer, K.D., Nitto, T., Wynn, T.A., Rosenberg, H.F., 2004. Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 76, 812–819.
- Tang, H., Sun, Y., Shi, Z., Huang, H., Fang, Z., Chen, J., et al., 2013. YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF- κ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration. *J. Immunol.* 190, 438–446.
- Thomsen, M., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., Dahl, M., 2011. Scavenger receptor AI/II truncation, lung function and COPD: a large population-based study. *J. Intern. Med.* 269, 340–348.
- Tomokiyo, R., Jinnouchi, K., Honda, M., Wada, Y., Hanada, N., Hiraoka, T., et al., 2002. Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors. *Atherosclerosis* 161, 123–132.
- Verrier, T., Solhonne, B., Sallenave, J.M., García-Verdugo, I., 2012. The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1377–1380.
- Wenzel, S.E., 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 18, 716–725.
- Woodruff, P.G., Boushey, H.A., Dolganov, G.M., Barker, C.S., Yang, Y.H., Donnelly, S., et al., 2007. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *PNAS* 104, 15858–15863.
- Woodruff, P.G., Modrek, B., Choy, D.F., Jia, G., Abbas, A.R., Ellwanger, A., et al., 2009. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 388–395.
- Yan, X., Chu, J.H., Gómez, J., Koenigs, M., Holm, C., He, X., 2015. Noninvasive analysis of the sputum transcriptome discriminates clinical phenotypes of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1116–1125.



Nonallergic Asthma and Its Severity: Biomarkers for Its Discrimination in Peripheral Samples

Selene Baos^{1,2}, David Calzada¹, Lucía Cremades-Jimeno¹, Joaquín Sastre^{2,3}, César Picado^{2,4}, Joaquín Quirarte⁵, Fernando Florido⁶, Carlos Lahoz^{1,2} and Blanca Cárdena^{1,2*}

¹Immunology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain, ³Allergy Department, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, ⁴Service of Pneumology, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ⁵Allergy Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain, ⁶Allergy Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Natalia V. Rivera,
Karolinska Institutet (KI),
Sweden

Reviewed by:

Giuseppina Ruggiero,
Università degli Studi di Napoli
Federico II, Italy
Jose Roberto Lapa e Silva,
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, Brazil
Mohib Uddin,
AstraZeneca, Sweden
Bruno Balbi,
Veruno (IRCCS), Italy

*Correspondence:

Blanca Cárdena
bcardaba@fjd.es

Specialty section:

This article was submitted
to Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 07 March 2018

Accepted: 06 June 2018

Published: 21 June 2018

Citation:

Baos S, Calzada D, Cremades-Jimeno L, Sastre J, Picado C, Quirarte J, Florido F, Lahoz C and Cárdena B (2018) Nonallergic Asthma and Its Severity: Biomarkers for Its Discrimination in Peripheral Samples. *Front. Immunol.* 9:1416. doi: 10.3389/fimmu.2018.01416

Asthma is a complex and heterogeneous respiratory disorder characterized by chronic airway inflammation. It has generally been associated with allergic mechanisms related to type 2 airway inflammation. Nevertheless, between 10 and 33% of asthmatic individuals have nonallergic asthma (NA). Several targeted treatments are in clinical development for patients with Th2 immune response, but few biomarkers have been defined for low or non-Th2-mediated inflammation asthma. We have recently defined by gene expression a set of genes as potential biomarkers of NA, mainly associated with disease severity: IL10, MSR1, PHLA1, SERPINB2, CHI3L1, IL8, and PI3. Here, we analyzed their protein expression and specificity using sera and isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). First, protein quantification was carried out using ELISA (in sera) or Western blot (proteins extracted from PBMCs by Trizol procedure), depending on the biomarker in 30 healthy controls (C) subjects and 30 NA patients. A receiver operating characteristic curve analysis was performed by using the R program to study the specificity and sensitivity of the candidate biomarkers at a gene- and protein expression level. Four kinds of comparisons were performed: total NA group vs C group, severe NA patients vs C, moderate–mild NA patients vs C, and severe NA patients vs moderate–mild NA patients. We found that all the single genes showed good sensitivity vs specificity for some phenotypic discrimination, with CHI3L1 and PI3 exhibiting the best results for C vs NA: CHI3L1 area under the curve (AUC) (CI 95%): 0.95 (0.84–1.00) and PI3 AUC: 0.99 (0.98–1.00); C vs severe NA: PI3 AUC: 1 (0.99–1.00); and C vs moderate–mild NA: CHI3L1 AUC: 1 (0.99–1.00) and PI3 AUC: 0.99 (0.96–1.00). However, the results for discriminating asthma disease and severity with protein expression were better when two or three biomarkers were combined. In conclusion, individual genes and combinations of proteins have been evaluated as reliable biomarkers for classifying NA subjects and their severity. These new panels could be good diagnostic tests.

Keywords: biomarkers, gene expression, nonallergic asthma, protein expression, severity, receiver operating characteristic

INTRODUCTION

Asthma is a complex respiratory disorder defined in the most recent Global Initiative for Asthma (1) as “a heterogeneous disease, usually characterized by chronic airway inflammation.” Asthma diagnosis is based on a history of respiratory symptoms, such as wheezing, shortness of breath, chest tightness, and cough, which varies over time and fluctuates in intensity. The World Health Organisation defines asthma as the most common chronic disease in children and estimates that more than 300 million people are affected (2). However, one of the major problems in defining this pathology is its wide clinical spectrum. It is generally accepted that clinical differences in treatment response and disease course are related to multiple underlying variations in genetic, pharmacologic, physiologic, biologic, and/or immunologic mechanisms that produce subclasses of phenotypes termed endotypes (3).

Despite this clinical heterogeneity, allergic mechanisms have been implicated in 50–80% of asthmatic patients and in approximately 50% of severe asthma (4, 5). Thus, asthma has generally been associated with type 2 airway inflammation characterized by elevated levels of immunoglobulin E, eosinophils, and several interleukins (IL), such as IL-4, IL-5, IL-13, and IL-9. Nevertheless, 10–33% of asthmatic individuals have nonallergic asthma (NA), or allergic sensitization that cannot be demonstrated (6). The generally accepted definition of NA includes negative skin prick or *in vitro*-specific IgE tests to a panel of local allergens, and at a minimum, a panel of perennial allergens; total serum IgE levels are typically normal or low (<150 IU/ml) (7). The mechanisms contributing to the non-type 2 immune response in asthmatic patients are less clear. Two major mechanisms leading to neutrophilic inflammation are postulated: dysregulated neutrophil-mediated immune responses due to respiratory infections (8) or defects in resolution of inflammation (9), and the activation of the IL-17-dependent pathway (10–14).

New strategies for the discovery and validation of biomarkers such as *omics* have been used to reveal the mechanisms responsible for asthma endotypes in different tissues. A biomarker is an objective, quantifiable biological parameter which serves as an index for health and physiological assessment. It could be the sign of a complex underlying *via* or an essential molecule associated directly with a main role in one endotype of a disease. Along these lines, many biomarkers targeted treatments are in clinical development for patients with Th2 immune response: anti-IL-4/IL-13, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IgE antibodies, and CRTh2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cell antagonists) (15–17), although in the latter case, two recently conducted large Phase 2 studies with CRTh2 antagonists have either failed to demonstrate significant efficacy in clinical endpoints compared to placebo (18) or showed a similar degree of improvement with the active control (19) in patients with atopic/allergic asthma.

Besides, to date, no endotype-driven interventions have been proven effective for non-type 2 immune response asthma (20). In summary, more information is needed to optimize the patient's therapeutic responses while avoiding adverse effects (20).

Against this backdrop, our research team has recently defined a group of genes that was differentially expressed in peripheral

samples from nonallergic asthmatic patients (low or non-Th2 inflammation) and mainly associated with disease severity (21, 22). The current study assessing gene and protein biomarkers is a follow up of our previous study (21, 22). Here, we explore the relevance of the gene and protein expression of these potential biomarkers according to sensitivity and specificity analysis [receiver operating characteristic (ROC) curves]. The ultimate aim is to provide useful new biomarkers for the NA disease.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study population comprised 60 unrelated subjects: 30 healthy control subjects (C) and 30 patients with NA. The samples of the asthma group came from the asthma biobank of the CIBERES located at the IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM in Madrid (IIS-FJD-UAM) (21, 22). These patients were diagnosed with severe, moderate, or mild asthma according to the Spanish Guidelines for the Management of Asthma, or GEMA (23). The daily mean of inhaled corticosteroids during the last 6 months, previous the diagnosis, and while taking the sample was: $1,488 \pm 541 \mu\text{g}$ in severe asthma, $1,100 \pm 977.75 \mu\text{g}$ in moderate asthma, and $450 \pm 463.68 \mu\text{g}$ in mild asthma. On the day of extraction of the sample, the subjects did not take any medication.

Pulmonary function tests were carried out by determining the predicted percentage of forced vital capacity (% FVC), forced expiratory volume in 1 s (% FEV₁), and the post bronchodilator test (% PBD) or reversibility test.

The control subjects were healthy, with no history of respiratory diseases. They were diagnosed at the Allergy Service of two hospitals in Andalusia (Spain), *Virgen del Rocío* University Hospital in Seville and *San Cecilio* University Hospital in Granada, and the samples were sent to the IIS-FJD-UAM to be processed.

All the subjects, controls, and NA patients, were tested by skin prick test against a panel of common allergens, including mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Lepidoglyphus destructor*), epithelia (cat and dog), cockroaches (*Blattella orientalis* and *Blattella germanica*), pollens (*Cypripedium*, *banana shadow*, olive, mixture of grasses, *Artemisia*, *Parietaria*, and *Salsola*), and fungi (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, and *Penicillium*).

Informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki was obtained from each subject. Ethical approval for the study was obtained from the ethical and research committees of the participating hospitals.

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Isolation and Protein Extraction

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from heparin-containing peripheral blood samples by gradient centrifugation using Lymphoprep (Comercial Rafer, Zaragoza, Spain) following the manufacturer's instructions. PBMCs were isolated in sterile conditions using endotoxin-free reagents. Total proteins were isolated from PBMCs (10^6 cells) using the Trizol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Protein levels were quantified by the BCA method (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Gene Selection

CD86, *IL10*, *MSR1*, *PHLDA1*, *SERPINB2*, *CHI3L1*, *CPA3*, *IL8*, and *PI3* were selected as candidate biomarkers of the NA group (significance established at a relative gene quantification higher than 4 or lower than 0.25 comparing the C group) (21).

CD86 and *CPA3* did not meet the strict criteria ($RQ > 4$ or < 0.25) in all of the comparisons (21), so we did not examine their expression at the protein level.

Soluble Protein Level Analysis of IL-10, CHI3L1, IL-8, PI3, and POSTN

Soluble biomarkers with an ELISA commercial available were quantified through this technique.

Levels of IL-10, CHI3L1, IL-8, PI3, and POSTN were measured in the subjects' serum using the human ELISA kits manufactured by ImmunoTools (Friesoythe, Germany) for IL-10; by R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) for CHI3L1, PI3, and POSTN; and by Diaclone (Besancon Cedex, France) for IL-8. The procedure was carried out in accordance with each manufacturer's protocol.

POSTN or periostin was analyzed at protein level given its relevance in the literature as a protein associated with asthma (24, 25).

Protein Analysis of MSR1, PHLDA1, and SERPINB2

Protein determination of MSR1, PHLDA1, and SERPINB2 was performed by Western blot because they were not soluble proteins or no ELISA commercial kit was available for their study. MSR1 was analyzed in 9 C and 18 NA patients (8 severe NA patients and 10 with moderate–mild diagnosis), PHLDA1 was studied in 8 C and 5 NA (3 severe and 2 moderate–mild patients), and we studied SERPINB2 in 6 C and 11 NA subjects (6 with severe asthma and 5 with moderate–mild diagnosis). The Western blot procedure used was that of the Invitrogen Western Breeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) previously described (21). The primary antibody used to detect MSR1 was the rabbit anti-human polyclonal CD204/macrophage scavenger receptor I antibody (dilution 1:2,500) by ThermoFisher Scientific. PHLDA1 was detected with a rabbit anti-human polyclonal PHLDA1 antibody (Thermo Fisher Scientific) at a 1:500 dilution and SERPINB2 with the rabbit anti-human polyclonal SERPINB2 antibody by R&D Systems at a dilution of 1:250. Data of specific protein results were relative to β -Actin (dilution 1:1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) expression using the ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science).

ROC Curve Analysis at the Gene and Protein Level

The ROC curve plots sensitivity vs specificity and the area under the curve (AUC) is an effective measure of accuracy for evaluating the diagnostic ability of tests to discriminate the true state of subjects, finding optimal cutoff values. A ROC curve was performed for the candidate biomarkers of the NA group, examining severity and expression at the genetic and protein level. Four kinds of

comparisons were performed: total NA group vs C group, severe NA patients vs C group, moderate–mild NA patients vs C group, and severe NA patients vs moderate–mild NA patients. As a guide for interpreting the ROC curves, the following intervals have been established for AUC values: 0.50–0.60, poor test; 0.61–0.75, regular test; 0.76–0.90, good test; 0.91–0.97, very good test; 0.98–1, excellent test. Besides, only the results with a CI 95% between 0.70 and 1 were considered statistically relevant.

Statistical Analysis

The levels and relative expression of the proteins studied were compared among groups by unpaired *t*-test, using the Graph-Pad InStat 3 program. Statistical significance was established in two-tailed *P* value < 0.05 . The ROC curve analyses were performed by using the R program.

RESULTS

Subjects

The demographic and clinical parameters of the population studied are summarized in **Table 1**. The NA patients were significantly older than the C subjects. The mean levels of total IgE were similar between the two groups, 75.02 ± 128.21 IU/ml in healthy control subjects vs 82.04 ± 80.63 IU/ml in NA patients ($p > 0.05$). However, % FEV₁ and % FVC showed statistically significant differences between severe NA vs moderate–mild NA patients (66.33 ± 16.62 vs 85.38 ± 21.03 , $P = 0.0127$ in % FEV₁; 69.93 ± 19.94 vs 94 ± 19.52 , $P = 0.0031$ in % FVC) (data not shown). Percentage and number of eosinophils in the NA group were normal (3.83 ± 2.24 vs 273.86 ± 137.13 cells/ μ l) (cutoff: 1–4% and 50–450 cells/ μ l). No significant differences were found in the presence of eosinophils between severe and moderate–mild NA subjects (percentage: 3.73 ± 2.48 vs $4.22 \pm 1.25\%$, respectively; number: 264 ± 152.96 vs 310 ± 52.57 cells/ μ l, respectively) (data not shown). Skin prick test against a panel of common allergens was negative in all the participants in this study. Concomitant diseases in the NA group were: nonatopic rhinitis (80%), sinusitis (56%), polyposis (33.3%), and esophageal reflux (20%).

ROC Curve Analysis at the Genetic Level

The genes studied were grouped into five categories based on the ROC curve analysis results (**Table 2**) (see Material and Methods).

Comparing the total subjects of the C and NA groups, we found that all genes fell into the “good” test category, except *CHI3L1* and *PI3* which obtained very good and excellent ratings, respectively. The results according to the severity of the NA group varied. When comparing C to moderate/mild NA subjects, *MSR1*, *IL10*, *CPA3*, *PHLDA1*, and *SERPINB2* maintained their “good” status, while *IL8* moved to a better ranking (very good), and *CD86* lowered to “regular.” *PI3* also maintained its excellent test position, joined by *CHI3L1*. The comparisons between C and severe NA patients differed from the overall analysis in some of the genes studied. While *IL8*, *CPA3*, *PHLDA1*, and *SERPINB2* stayed in the good test category and *PI3* continued to be excellent, *MSR1*, *IL10*, and *CD86* moved up to the “very good” test position, and *CHI3L1* was lowered to “good.”

TABLE 1 | Characteristics of the study population.

	N	Sex	Age	Smoking	Clinical diagnosis	Total IgE (IU/ml)	% FVC	% FVE ₁	% eosinophils	Number of eosinophils (cells/ μ l)
Control (C) subjects	30	67.86% women 32.14% men	45.66 \pm 12.39	92.86% non-smokers 7.14% smokers 0% ex-smokers	100% healthy	75.02 \pm 128.21	-	-	-	-
Nonallergic asthmatic (NA) subjects	30	73.33% women 26.67% men	58.03 \pm 13.14 ^a	73.33% non-smokers 10% smokers 16.67% ex-smokers	50% severe asthma 30% moderate asthma 20% mild asthma	82.04 \pm 80.63	81.11 \pm 22.69	75.18 \pm 22.82	3.83 \pm 2.24	273.86 \pm 137.13

% FVC: percentage of predicted value of forced vital capacity; % FVE₁: percentage of predicted value of forced expiratory volume in 1 s.

^aStatistically significant comparison ($P < 0.05$) between C and NA group.

CD86 was the only good biomarker for asthma-severity discrimination. The rest of the genes were found to be “regular” or “poor” for discriminating moderate–mild NA from severe NA patients.

Protein Expression

SERPINB2 and PHLDA1 were quantified in the total protein extracted from PBMCs. Levels of IL-10, CHI3L1, PI3, and POSTN proteins were measured in the sera of the study population. Relative quantification and mean sera levels (expressed as pg/ml) are summarized in **Figure 1**. Only SERPINB2 and POSTN showed statistically significant differences. For SERPINB2, the control group (0.66 ± 0.31) had a higher expression than the total NA patients (0.11 ± 0.05 , $P < 0.0001$). These differences were also shown when the C group was compared with the severe NA (0.13 ± 0.07 , $P = 0.0019$) and moderate–mild NA (0.09 ± 0.03 , $P = 0.0029$) groups. In contrast, the protein levels of POSTN were higher in the total NA group ($18,679.59 \pm 8,086.07$ pg/ml), as well as in the severe ($20,198.91 \pm 7,859.24$ pg/ml) and, in the moderate–mild NA patients ($17,160.28 \pm 7,930.59$ pg/ml) compared to the C group ($15,487.71 \pm 6,532.85$ pg/ml), but only in the severe asthma patients were the differences statistically significant.

Though there were no statistically significant differences in the other proteins studied, a tendency was observed when the NA patients were analyzed according to severity. The IL-10 levels were higher in severe (200.60 ± 219.85 pg/ml) diagnosed subjects compared to C subjects (123.38 ± 120.61 pg/ml) and to moderate–mild NA patients (105.27 ± 79.62 pg/ml). This same tendency was observed in PI3: severe NA group: $6,225.03 \pm 1,999.11$ pg/ml, moderate–mild NA group: $5,824.14 \pm 2,624.29$ pg/ml, and C subjects: $6,056.30 \pm 2,535.83$ pg/ml. In contrast, PHLDA1 and CHI3L1 showed the highest levels in moderate–mild NA patients (moderate–mild NA: 0.08 ± 0.10 ; severe NA: 0.05 ± 0.07 ; C: 0.04 ± 0.05 for PHLDA1; and moderate–mild NA: $21,702.56 \pm 11,589.97$ pg/ml; severe NA: $17,026.99 \pm 4,845.20$ pg/ml; C: $15,729.18 \pm 8,576.85$ pg/ml for CHI3L1). Protein expression of MSR1 and IL-8 were previously discussed (22). Briefly, IL-8 protein expression showed slight but non-significant differences between severe (505.49 ± 387.8 pg/ml) and moderate–mild (377.7 ± 338.27 pg/ml) NA patients; and for MSR1 two proteic bands were found by Western blot, with distinct behaviors. The lower molecular weight band showed statistical differences between C subjects and NA subjects.

ROC Curve Analysis at the Protein Level

The MSR1's lower band and SERPINB2 were the best individual biomarkers at the protein level according to the ROC curve results (**Table 2**). These two biomarkers were classified as “very good” for comparing the whole group of NA and severe patients vs the control group. For discriminating the moderate–mild patients from controls, the MSR1's lower band was “excellent” and SERPINB2 was “good.”

Overall, all other biomarkers fell into the “poor” or “regular” test category (**Table 2**). PI3, IL-10, and MSR1's upper band would be considered poor biomarkers. The same was the case for CHI3L1 and IL-8, except when classifying severe NA patients and when discriminating moderate–mild from severe patients in the

TABLE 2 | Classification of biomarkers by the receiver operating characteristic (ROC) curves analysis.

Comparison/AUC (CI 95%)	Excellent test (0.98–1)	Very good (0.91–0.97)	Good (0.76–0.90)	Regular (0.61–0.75)	Poor (0.5–0.60)
(A) Gene expression level					
C vs NA	PI3, 0.99	CHI3L1, 0.95	IL8, 0.90 MSR1, 0.89 CPA3, 0.88 IL10, 0.87 SERPINB2, 0.84 PHDLA1, 0.83 CD86, 0.81		
C vs MM	CHI3L1, 1 PI3, 0.99	IL8, 0.91	CPA3, 0.88 SERPINB2, 0.86 MSR1, 0.82 IL10, 0.79 PHDLA1, 0.77	CD86, 0.71	
C vs S	PI3, 1	MSR1, 0.94 IL10, 0.94 CD86, 0.91	CHI3L1, 0.89 IL8, 0.89 PHDLA1, 0.89 CPA3, 0.88 SERPINB2, 0.82		
MM vs S			CD86, 0.78	MSR1, 0.66 CPA3, 0.65 PHDLA1, 0.62	PI3, 0.60 IL8, 0.53 IL 10, 0.51 SERPINB2, 0.51
(B) Protein expression level					
C vs NA		MSR1 low, 0.96 SERPINB2, 0.91		POSTN, 0.62	CHI3L1, 0.6 MSR1 up, 0.6 IL8, 0.5 PI3, 0.5 IL10, PHDLA1<0.5
C vs S		MSR1 low, 0.93 SERPINB2, 0.93		CHI3L1, 0.63 IL8, 0.62	MSR1 up, 0.60 IL10, 0.56 POSTN, 0.55 PI3, 0.52 PHDLA1, ND
C vs MM	MSR1 low, 1		SERPINB2, 0.89	POSTN, 0.69 IL8, 0.62	MSR1 up, 0.6 CHI3L1, 0.56 PI3, 0.51 IL10<0.5 PHDLA1, ND
MM vs S			IL8, 0.76	SERPINB2, 0.7 POSTN, 0.65 CHI3L1, 0.62	PI3, 0.55 MSR1 low, 0.55 IL10, MSR1 up<0.5 PHDLA1, ND

Summary of the ROC curve analysis of the most important biomarkers by comparison. AUC: area under the curve. ND: non-determined because of lack of data. C: control group. NA: total nonallergic asthma group. MM: group of subjects with moderate–mild asthma. S: group of subjects with severe asthma. MSR1 low: MSR1's lower band protein expression. MSR1 up: MSR1's upper band protein expression.

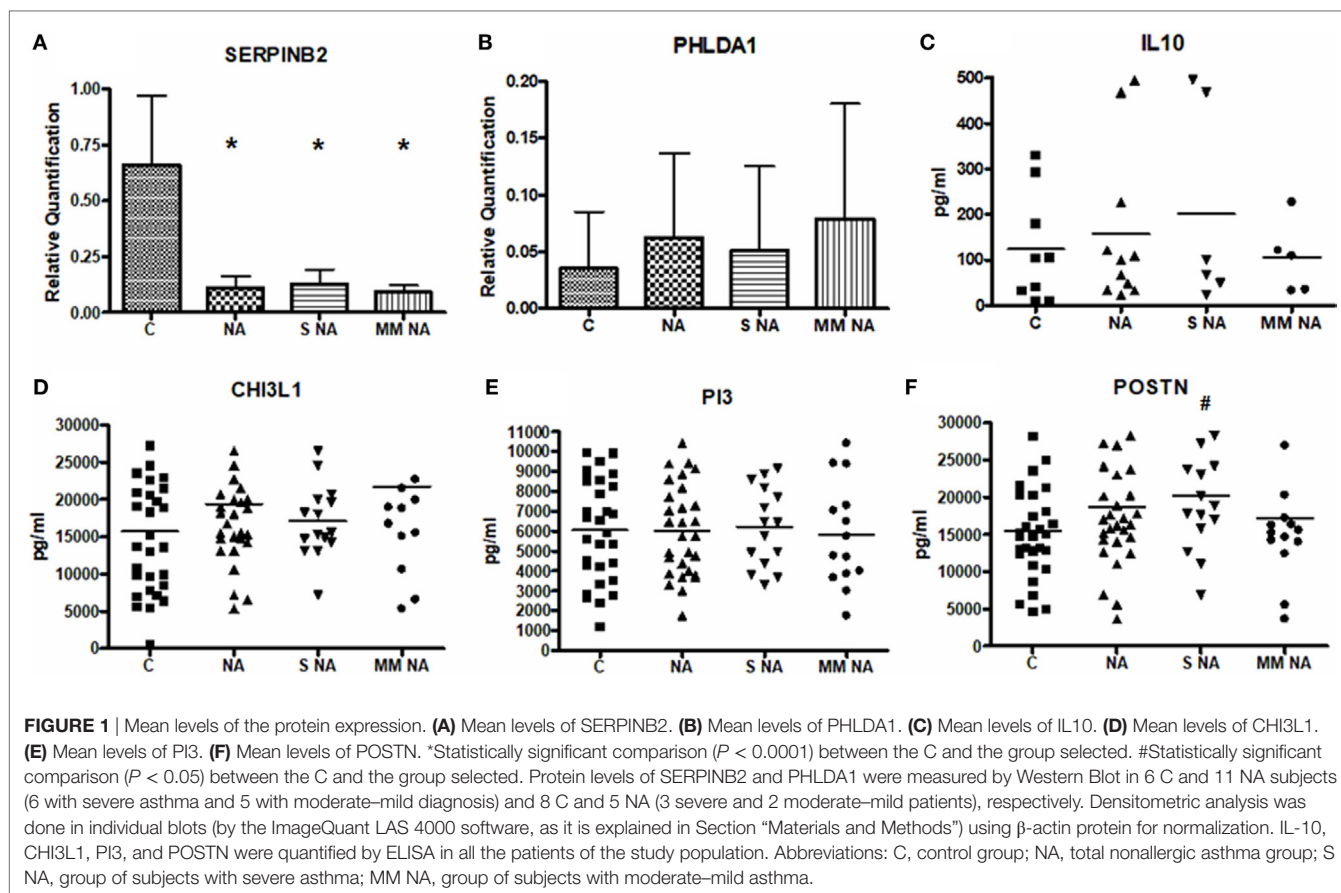
case of CHI3L1, and for IL-8 (when comparing moderate–mild and severe patients to healthy subjects), whose expression rose to “regular.” Additionally, IL-8 was able to discriminate moderate–mild from severe patients with a good AUC value (0.76). POSTN was classified as “regular” when comparing the total and the moderate–mild NA subjects and “poor” for the severe patients.

Given the poor results obtained in the individual ROC curve study of several biomarkers, an analysis of the AUC values combining two and three biomarkers was carried out.

The results of the analysis combining two proteins are summarized in **Table 3**. There was an improvement of the sensitivity and the specificity or synergy when several biomarkers

were combined in the discrimination of total NA vs C groups (**Table 3A**): this is the case for MSR1's upper band + MSR1's lower band, CHI3L1 + MSR1's upper band and POSTN + PHDLA1.

When the analyses performed were comparing moderate–mild NA subjects and the C group (**Table 3B**), the results showed strong synergies between CHI3L1 + MSR1's upper band, CHI3L1 + SERPINB2, IL-8 + PI3, IL-8 + POSTN, POSTN + MSR1's upper band, and POSTN + SERPINB2. In the comparison of severe NA subjects (**Table 3C**) with C group, the improvement of the AUC values was observed in the MSR1's upper band + MSR1's lower band, CHI3L1 + MSR1's lower band, and in POSTN + SERPINB2.



The combination of three biomarkers (**Table 4**) gave very interesting combinations, with AUC values over 0.75, meaning that good, very good, or excellent test were found for discriminating asthma and its severity from the control population. In the case of the total NA group (**Table 4A**), the following synergies were of great sensitivity and specificity: CHI3L1 + PI3 + MSR1's upper band, CHI3L1 + POSTN + MSR1's upper band, CHI3L1 + POSTN + PHLDA1, CHI3L1 + POSTN + SERPINB2, PI3 + POSTN + MSR1's upper band, PI3 + POSTN + PHLDA1, and PI3 + POSTN + SERPINB2. The analysis of the moderate-mild NA patients compared with the C group (**Table 4A**) shared several combinations of biomarkers with the total NA group: CHI3L1 + PI3 + MSR1's upper band, PI3 + POSTN + MSR1's upper band, and PI3 + POSTN + SERPINB2, but particular of this comparison were CHI3L1 + IL-8 + PI3, CHI3L1 + IL-8 + POSTN, and IL-8 + PI3 + POSTN. The discrimination of severe patients from control subjects shared combinations of biomarkers with the other two comparisons. Important synergies were observed with PI3 + POSTN + MSR1's upper band and PI3 + POSTN + MSR1's lower band. As well as in the moderate-mild patients, CHI3L1 + IL-8 + PI3 was an interesting combination for discriminating severe subjects from C group.

The comparison between the moderate-mild NA and severe NA subjects was also performed (**Table 2**, **Table 3D**, and **Table 4B**). In the individual analysis, all the biomarkers were classified as “regular” or “poor,” except IL-8, whose AUC value

was good. When two biomarkers were combined, the combinations of CHI3L1 + POSTN, IL10 + POSTN, IL-8 + PI3, and SERPINB2 + POSTN were good to discriminate severe from moderate-mild asthma, and of smaller importance was the grouping of IL-8 + POSTN. In the three-biomarker analysis, the list of important synergies is longer (**Table 4B**).

There was an improvement of the sensitivity and the specificity or synergy when several biomarkers were combined, obtaining very interesting combinations, with AUC values over 0.75, meaning that good, very good, or excellent test were found for discriminating phenotypic conditions. Bringing together all the results, we established a ranking of the best biomarkers or cluster of biomarkers able to discriminate each condition analyzed, with a predictive accuracy of at least very good ($AUC > 0.75$). These rankings are shown in **Table 5**. It is worth highlighting the permanent presence of POSTN in most of the combinations able to discriminate moderate-mild and severe NA patients, as well as the best combination for this discrimination, CHI3L1 + IL-8 + POSTN.

DISCUSSION

There is a real need to improve the diagnosis and treatment of the asthmatic disease. Many efforts are being undertaken to define new biological therapies against specific targets that define asthma mediated by Th2 inflammation; however, a substantial number of asthmatic patients present low or non-Th2 inflammation.

TABLE 3 | Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses of the protein expression combining two biomarkers.

	CHI3L1	IL-10	IL-8	PI3	POSTN	MSR1 up	MSR1 low	PHLDA1	SERPINB2
(A) Total nonallergic asthma (NA) group compared with the control group									
CHI3L1	0.60	0.48	0.67	0.59	0.63	0.78	0.97	0.70	0.92
IL-10	–	0.42	ND	0.59	0.47	ND	ND	ND	ND
IL-8	–	ND	0.50	0.61	0.74	ND	ND	ND	ND
PI3	–	–	–	0.50	0.67	0.63	0.96	0.47	0.91
POSTN	–	–	–	–	0.62	0.73	0.96	0.82	0.95
MSR1 up	–	ND	ND	–	–	0.60	1	ND	ND
MSR1 low	–	ND	ND	–	–	–	0.96	ND	ND
PHLDA1	–	ND	ND	–	–	ND	ND	0.42	ND
SERPINB2	–	ND	ND	–	–	ND	ND	ND	0.91
(B) Moderate–mild NA group compared with the control group									
CHI3L1	0.56	0.41	0.63	0.56	0.70	0.83	ND	ND	0.97
IL-10	–	0.41	ND	0.67	0.63	ND	ND	ND	ND
IL-8	–	ND	0.62	0.76	0.87	ND	ND	ND	ND
PI3	–	–	–	0.51	0.69	0.61	ND	ND	0.89
POSTN	–	–	–	–	0.69	0.81	ND	ND	0.97
MSR1 up	–	ND	ND	–	–	0.60	ND	ND	ND
MSR1 low	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.48	ND
SERPINB2	–	ND	ND	–	–	ND	ND	ND	0.89
(C) Severe NA group compared with the control group									
CHI3L1	0.63	0.62	0.67	0.63	0.64	0.76	0.94	ND	0.93
IL-10	–	0.56	ND	0.51	0.60	ND	ND	ND	ND
IL-8	–	ND	0.62	0.46	0.57	ND	ND	ND	ND
PI3	–	–	–	0.52	0.65	0.64	0.95	ND	0.93
POSTN	–	–	–	–	0.55	0.66	0.93	ND	0.97
MSR1 up	–	ND	ND	–	–	0.60	1	ND	ND
MSR1 low	–	ND	ND	–	–	–	0.93	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.48	ND
SERPINB2	–	ND	ND	–	–	ND	ND	ND	0.93
(D) Moderate–mild NA group compared with the severe group									
CHI3L1	0.62	0.43	0.76	0.56	0.77	0.68	0.65	ND	0.63
IL-10	–	0.47	ND	0.63	0.77	ND	ND	ND	ND
IL-8	–	ND	0.76	0.82	0.78	ND	ND	ND	ND
PI3	–	–	–	0.55	0.57	0.60	0.60	ND	0.73
POSTN	–	–	–	–	0.65	0.64	0.62	ND	0.90
MSR1 up	–	ND	ND	–	–	0.46	0.55	ND	ND
MSR1 low	–	ND	ND	–	–	–	0.55	ND	ND
PHLDA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.48	ND
SERPINB2	–	ND	ND	–	–	ND	ND	ND	0.70

In bold are the area under the curve values greater than 0.75, which are considered good, very good, or excellent tests. ND: non-determined because of lack of data. Cells with a dash refer to a comparison already shown in another cell of this table. MSR1 low: MSR1's lower band protein expression. MSR1 up: MSR1's upper band protein expression. In gray are indicated the individual ROC curve analysis of the protein expression of the nine biomarkers.

We recently defined a group of genes differentially expressed in peripheral samples from nonallergic asthmatic patients (low or non-Th2 inflammation) and some of them, mainly associated with

the severity of these diseases. In this report, we further explore the relevance of the gene and protein expression of these potential biomarkers, through the analysis of their individual and/or combined

TABLE 4 | Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the protein expression combining three biomarkers.

(A) NA compared with the C			
Combination of biomarkers	NA vs C area under the curve (AUC) value	MM vs C AUC value	S vs C AUC value
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0.59	0.67	0.64
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0.53	0.63	0.64
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0.67	0.79	0.79
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0.72	0.87	0.67
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0.66	0.68	0.62
CHI3L1 + PI3 + MSR1 up	0.77	0.83	0.64
CHI3L1 + PI3 + MSR1 low	0.97	ND	0.95
CHI3L1 + PI3 + PHLDA1	0.70	ND	ND
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0.92	ND	0.93
CHI3L1 + POSTN + MSR1 up	0.83	0.88	0.76
CHI3L1 + POSTN + MSR1 low	0.97	ND	0.94
CHI3L1 + POSTN + PHLDA1	0.78	ND	ND
CHI3L1 + POSTN + SERPINB2	0.94	ND	ND
IL-10 + PI3 + POSTN	0.57	0.61	0.60
IL-8 + PI3 + POSTN	0.75	0.84	0.62
PI3 + POSTN + MSR1 up	0.77	0.81	0.77
PI3 + POSTN + MSR1 low	0.97	ND	0.96
PI3 + POSTN + PHLDA1	0.78	ND	ND
PI3 + POSTN + SERPINB2	0.94	0.97	ND
(B) Moderate-mild NA compared with the severe group			
Combination of biomarkers	AUC value		
CHI3L1 + IL-10 + PI3	0.63		
CHI3L1 + IL-10 + POSTN	0.77		
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0.88		
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0.98		
CHI3L1 + PI3 + POSTN	0.76		
CHI3L1 + PI3 + MSR1 up	0.78		
CHI3L1 + PI3 + MSR1 low	0.68		
CHI3L1 + PI3 + SERPINB2	0.73		
CHI3L1 + POSTN + MSR1 up	0.80		
CHI3L1 + POSTN + MSR1 low	0.80		
CHI3L1 + MSR1 up + MSR1 low	0.68		
IL-10 + PI3 + POSTN	0.77		
IL-8 + PI3 + POSTN	0.82		
PI3 + POSTN + MSR1 up	0.60		
PI3 + POSTN + MSR1 low	0.60		
PI3 + POSTN + SERPINB2	0.93		
PI3 + MSR1 up + MSR1 low	0.60		
POSTN + MSR1 up + MSR1 low	0.62		

In bold are the AUC values greater than 0.75, which are considered good, very good, or excellent tests. C: control group. NA: total nonallergic asthma group. MM: group of subjects with moderate-mild asthma. S: group of subjects with severe asthma. MSR1 low: MSR1's lower band protein expression. MSR1 up: MSR1's upper band protein expression.

expression, in order to demonstrate their ability to discriminate asthma disease and severity. This study seeks to provide different panels of biomarkers associated with NA disease that could be useful for the diagnosis and/or therapy of this phenotype of asthma.

The ideal biomarker should be sensitive, specific, simple to perform, non-invasive, and inexpensive if possible (26). In the present report, we have evaluated the potential of nine genes and proteins to serve as biomarkers using peripheral blood samples from healthy controls and nonallergic asthmatic patients. We first analyzed their ability to discriminate asthmatic patients from healthy controls; second, we examined their potential as

TABLE 5 | Ranking of the best individual and combined proteic biomarkers for each discrimination.

	Area under the curve (AUC) (IC 95%) value	Threshold
(A) Biomarkers able to discriminate NA patients from C group		
MSR1 low	0.96 (0.89–1.00)	0.148
SERPINB2	0.91 (0.72–1.00)	0.404
MSR1 low + MSR1 up	1	0.148, 0.208
CHI3L1 + MSR1 low	0.97 (0.91–1.00)	13,064, 0.148
POSTN + SERPINB2	0.95 (0.85–1.00)	13,633, 0.404
CHI3L1 + SERPINB2	0.92 (0.77–1.00)	13,064, 0.404
POSTN + PHLDA1	0.82 (0.59–1.00)	13,633, 0.011
CHI3L1 + MSR1 up	0.78 (0.60–0.95)	13,064, 0.208
PI3 + POSTN + MSR1 low	0.97 (0.90–1.00)	6,528, 13,633, 0.148
CHI3L1 + POSTN + MSR1 up	0.83 (0.67–0.98)	13,064, 13,633, 0.208
PI3 + POSTN + MSR1 up	0.77 (0.58–0.96)	6,528, 13,633, 0.208
(B) Biomarkers able to discriminate the moderate/mild NA patients from the C group		
MSR1 low	1	0.148
SERPINB2	0.89 (0.66–1.00)	0.404
CHI3L1 + SERPINB2	0.97 (0.90–1.00)	13,064, 0.404
POSTN + SERPINB2	0.97 (0.90–1.00)	15,787, 0.404
IL-8 + POSTN	0.87 (0.70–1.00)	677, 15,787
CHI3L1 + MSR1 up	0.83 (0.63–1.00)	13,064, 0.208
POSTN + MSR1 up	0.81 (0.58–1.00)	15,787, 0.208
IL-8 + PI3	0.76 (0.50–1.00)	677, 3,074
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0.87 (0.70–1.00)	13,064, 677, 15,787
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0.79 (0.55–1.00)	13,064, 677, 3,074
(C) Biomarkers able to discriminate the severe NA patients from the C group		
MSR1 low	0.93 (0.80–1.00)	0.137
SERPINB2	0.93 (0.78–1.00)	0.359
MSR1 low + MSR1 up	1	0.137, 0.254
POSTN + SERPINB2	0.97 (0.87–1.00)	13,633, 0.359
PI3 + MSR1 low	0.95 (0.85–1.00)	6,528, 0.137
CHI3L1 + MSR1 low	0.94 (0.83–1.00)	14,367, 0.137
CHI3L1 + MSR1 up	0.76 (0.50–1.00)	14,367, 0.254
PI3 + POSTN + MSR1 low	0.96 (0.88–1.00)	6,528, 13,633, 0.137
CHI3L1 + PI3 + MSR1 low	0.95 (0.86–1.00)	14,367, 6,528, 0.137
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0.79 (0.56–1.00)	14,367, 262, 6,528
PI3 + POSTN + MSR1 up	0.77 (0.54–0.99)	6,528, 13,633, 0.254
(D) Biomarkers able to discriminate the moderate/mild NA patients from the severe NA group		
IL-8	0.76 (0.49–1.00)	841
POSTN + SERPINB2	0.90 (0.71–1.00)	17,419, 0.132
IL-8 + PI3	0.82 (0.58–1.00)	841, 4,845
IL-8 + POSTN	0.78 (0.52–1.00)	841, 17,419
CHI3L1 + POSTN	0.77 (0.59–0.96)	18,500, 17,419
IL-10 + POSTN	0.77 (0.43–1.00)	105.2, 17,419
CHI3L1 + IL-8 + POSTN	0.98 (0.92–1.00)	18,500, 841, 17,419
PI3 + POSTN + SERPINB2	0.93 (0.78–1.00)	4,845, 17,419, 0.132
CHI3L1 + IL-8 + PI3	0.88 (0.69–1.00)	18,500, 841, 4,845
CHI3L1 + POSTN + MSR1 up	0.80 (0.57–1.00)	18,500, 17,419, 0.257
CHI3L1 + POSTN + MSR1 low	0.80 (0.57–1.00)	18,500, 17,419, 0.056
CHI3L1 + PI3 + MSR1 up	0.78 (0.53–1.00)	18,500, 4,845, 0.257

Summary of the best options for discriminating each condition, obtained from the ROC curve analysis of protein expression from each of the nine biomarkers, alone or in combination. C: control group. NA: nonallergic asthma group. MM: group of subjects with moderate-mild asthma. S: group of subjects with severe asthma. MSR1 low: MSR1's lower band protein expression. MSR1 up: MSR1's upper band protein expression. Threshold means the proteic levels of each biomarker able to discriminate each condition, with the AUC indicated. In bold are marked the options with the best statistical power (CI 95% between 0.7 and 1).

biomarkers of the degree of severity, comparing severe and/or moderate–mild patients with healthy control subjects; and last, we studied their potential to discriminate severity from moderate–mild in nonallergic asthmatic disease. As summarized in **Table 2**, all the genes were able to discriminate any of the phenotypical condition (NA, severe NA, or mild/moderate NA) with AUC values from excellent to good (ranging from 1 to 0.77), with the only exception of *CD86*, which was the poor biomarker for discriminating moderate/mild NA patients from controls (AUC: 0.71). According to these data, *PI3*, *CHI3L1*, and *IL8* are the best gene biomarkers (excellent or very good AUC) for discriminating NA from healthy control subjects, as well as for discriminating NA moderate/mild patients from control subjects. These results are in concordance with the recent description of the protective effect of *PI3* against adult asthma (27). *PI3* or Elafin, is a potent inhibitor of serine proteases, which plays a central role in controlling excessive activity of neutrophil elastase. It is a modulator of many parameters that are critical for inflammation, although it has pleiotropic effects (28). *CHI3L1* or YKL-40 is thought to play a role in tissue inflammation and remodeling (29), and its role as a possible biomarker has been reviewed in YKL-40 regulated signaling mechanisms (30). Also, correlations between YKL-40 levels and neutrophilic inflammation have been described (31). Finally, *IL8* (a member of the CXC chemokines) is considered to be one of the main mediators of the inflammatory response and very important for the survival and chemotaxis of neutrophils. It is secreted by several cell types and has been associated with several respiratory disorders (32).

These three biomarkers (*PI3*, *CHI3L1*, and *IL8*) are closely related to neutrophils, suggesting the relevance of this kind of cells in noneosinophilic nonallergic asthmatic disease and severity (data here cannot be demonstrated because neutrophils were not determined).

PI3, *IL10*, *MSR1*, and *CD86* were the gene biomarkers that best discriminated controls from NA patients with severe clinical features. *IL10* has pleiotropic effects in immunoregulation and inflammation (33). It has been extensively related with asthma and allergic diseases (34).

MSR1 or macrophage scavenger receptor type I, or CD204 has been described in many cell locations (usually in tissues), such as vascular smooth muscle cells, endothelial cells, human lung epithelial cells, etc. (35). This fact increases its pathophysiological potential, and has been described as a central pivot of health and disease (36). *MSR1* was associated with asthma and was postulated by our group as a very good biomarker candidate for severity in several respiratory diseases (21).

CD86 or *B7.2*, encodes a type I membrane protein expressed on antigen-presenting cells (APCs) and which provides costimulatory signals necessary for the initiation, modulation, and regulation of an effective T cell response. Most APCs constitutively express low levels of *CD86*, but following activation they are rapidly upregulated (37). Interestingly, in this study, *CD86* was the only gene biomarker capable of discriminating severe NA from moderate–mild NA patients, featuring a good AUC value (0.76). *CD86* was followed by *MSR1* (AUC: 0.66), *CPA3* (0.65), and *PHLDA1* (0.62), which were classified as regular biomarkers for this discrimination. *CPA3* or carboxypeptidase A3, is a

metalloexopeptidase specifically expressed by mast cells (38). *CPA3* was described as the best individual discriminator for eosinophilic asthma in a study of six gene biomarkers in sputum (39). *PHLDA1* is a nuclear protein that has been postulated as a biomarker in the early detection and/or therapy of gastric cancer (40), but never before has been associated with asthma disease. Overall, these gene analyses strengthen our previous results and evidence the potential of these nine gene biomarkers. For that, the next step was to determine the effectiveness of these biomarkers at the protein level using when it was available (*IL-10*, *CHI3L1*, *IL-8*, and *PI3*) the serum-ELISA as a quantitative assay that is commonly useful to analyze soluble biomarkers due to its sensitivity, specificity, and simplicity. On the other hand, although our gene expression results did not revealed *POSTN* as a differential gene, we decided to include the analysis of periostin levels in the serum, as it is one of the main biomarkers described as indicator of Th2-inflammation (41, 42) and the serum periostin levels have been related to the response to anti-IL-13 therapy in patients with moderate–mild asthma (43).

The individual protein biomarkers results are summarized in **Table 2**. *MSR1*'s lower band and *SERPINB2* were the best individual biomarkers for discriminating the NA group and its severity from healthy control subjects. *SERPINB2* is a member of the group of inhibitors of the serine protease family, enzymes that inhibit protease cathepsin G neutrophils and chymase of mast cells. *SERPINB2* has been detected in different cell types, playing a role in inflammation and remodeling (44). It has been tentatively suggested that *SERPINB2* represents a novel effector of the multiple airway remodeling actions provoked by IL-13 (45). It has been described, together with *POSTN* and chloride channel accessory 1, as a gene-signature for Th2 asthma and mainly IL-13 asthma phenotype (41), but until our knowledge, *SERPINB2* protein expression has only been studied in bronchoalveolar lavage (BAL) and never before at a peripheral level.

IL-8 was the only individual protein biomarker with a good predictive accuracy for discriminating clinical severity between moderate–mild vs severe patients (AUC: 0.76), although with a moderate statistical power (CI 95%, 0.49–1). These results could highlight the relevance of *IL-8* and indirectly confirm the recent publication in BAL, describing that neutrophils and *IL-8* are the only inflammatory components that distinguish controlled from uncontrolled asthma (46), but should be confirmed in a larger population. In this regard, novel small molecules targeting neutrophilic inflammation, such as chemokine (CXC) receptor 2 (CXCR2) antagonists have been analyzed in the noneosinophilic asthma context, showing how these antagonists reduce neutrophils, but do not improve clinical outcomes in studies to date (47). Ligands for the CXCR2 receptor include the chemokines CXCL8 (*IL-8*). Recent studies indicate that while selective CXCR2 antagonists were found to significantly lower airway neutrophil counts in a mechanistic 1-month pilot study in more severe asthmatics (48), a lack of efficacy was observed in a larger 6-month clinical Ph2 trial [$n = 640$] specifically targeting CXCR2/*IL-8* pathway in this defined asthma population (49).

The next step was to analyze the change in the predictive results after combining two (Table 3A–D) or three biomarkers (Table 4A and B). Table 5 shows the global analyses, with the ranking of the best individual or combined biomarkers for each of the comparisons performed. Overall, we had very good AUC results, and here we propose four protein panels of individual biomarkers as well as different combinations of biomarkers for the diagnosis and/or prognosis of NA using peripheral samples and standard techniques. We would like to highlight the combination of CHI3L1 + IL-8 + POSTN for discriminating moderate–mild NA from severe NA (Table 5 and Table 4B), as this had the best AUC (0.98). Previously, serum concentrations of CHI3L1 were associated with the severity of asthma and were inversely correlated with lung function and FEV₁ (50), indicating that serum CHI3L1 was important in the specific inflammatory phenotype of asthma. However, more recently it has been described in a large group of patients with asthma, that serum concentrations of CHI3L1 were only slightly increased in those with the most severe asthma (51). Interestingly, contrasting with those previous results, in this study CHI3L1 protein levels were higher in moderate–mild patients compared with severe asthmatic patients (Figure 1), and, together with the levels of IL-8 and periostin, could be tested in an easy and reproducible ELISA to verify predictable disease severity in nonallergic patients. Although these results are very encouraging, we believe they should be tested in larger populations, with the same age-range and by different groups in order to test their reproducibility and to validate them.

REFERENCES

- GINA. *Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. (2017). Available from: <http://www.ginasthma.org/>
- Mukherjee AB, Zhang Z. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factor. *J Biol Chem* (2011) 286:32883–9. doi:10.1074/jbc.R110.197046
- Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med* (2015) 372:793–5. doi:10.1056/NEJMp1500523
- D'Amato G, Stanzola A, Sanduzzi A, Liccardi G, Salzillo A, Vitale C, et al. Treating severe allergic asthma with anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab): a review. *Multidiscip Respir Med* (2014) 9:23. doi:10.1186/2049-6958-9-23
- Holgate ST. Stratified approaches to the treatment of asthma. *Br J Clin Pharmacol* (2012) 76:277–91. doi:10.1111/bcp.12036
- Peters SP. Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2014) 2:650–2. doi:10.1016/j.jaip.2014.09.006
- Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* (2003) 112:252–62. doi:10.1067/mai.2003.1595
- Green BJ, Wiriyachaiporn S, Grainge C, Rogers GB, Kehagia V, Lau L, et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. *PLoS One* (2014) 9(6):e100645. doi:10.1371/journal.pone.0100645
- Uddin M, Nong G, Ward J, Seumois G, Prince LR, Wilson SJ, et al. Prosurvival activity for airway neutrophils in severe asthma. *Thorax* (2010) 65:684–9. doi:10.1136/thx.2009.120741
- Peters MC, Mekonnen ZK, Yuan S, Bhakta NR, Woodruff PG, Fahy JV. Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 133:388–94. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.036
- Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* (2002) 57:875–9. doi:10.1136/thorax.57.10.875
- Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* (2006) 7:135. doi:10.1186/1465-9921-7-135
- Simpson JL, Gibson PG, Yang IA, Upham J, James A, Reynolds PN, et al. Impaired macrophage phagocytosis in non-eosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy* (2013) 43:29–35. doi:10.1111/j.1365-2222.2012.04075.x
- Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Böck A, Otto R, Prazeres da Costa O, et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2015) 135:81–91. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.046
- Boyman O, Kaegi C, Akdis M, Bavbek S, Bossios A, Chatzipetrou A, et al. EAACI IG biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders. *Allergy* (2015) 70:727–54. doi:10.1111/all.12616
- Radonjic-Hoesli S, Valent P, Klion AD, Wechsler ME, Simon HU. Novel targeted therapies for eosinophil-associated diseases and allergy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2015) 55:633–56. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124407
- Singh D, Ravi A, Southworth T. CRTH2 antagonists in asthma: current perspectives. *Clin Pharmacol* (2017) 15:165–73. doi:10.2147/CPAA.S119295
- Bateman ED, O'Brien C, Rugman P, Luke S, Ivanov S, Uddin M. Efficacy and safety of the CRTh2 antagonist AZD1981 as add-on therapy to inhaled corticosteroids and long-acting β_2 -agonists in patients with atopic asthma. *Drug Des Devel Ther* (2018) 4:1093–106. doi:10.2147/DDDT.S147389
- Bateman ED, Guerreros AG, Brockhaus F, Holzhauser B, Pethe A, Kay RA, et al. Fevipiprant, an oral prostaglandin DP₂ receptor (CRTh2) antagonist, in allergic asthma uncontrolled on low-dose inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* (2017) 50(2). doi:10.1183/13993003.00670-2017
- Muraro A, Lemanske RF, Hellings PW, Akdis CA, Bieber T, Casale TB, et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: airway diseases and atopic

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SB, DC, and BC have worked in all project-steps: design of study, experimental work, results discussion, and manuscript elaboration. LC-J collaborated in the manuscript elaboration. JS, CP, JQ, and FF performed the patient's selection and collaborated in the design of study. CL has collaborated in design of study, results discussion, and manuscript elaboration.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by research grants supported in part by research grants PI13/01730 and PI17/01682, cofinanced by FEDER, CIBERES (ISCIII, 0013), and RETIC (RD09/0076/00101) from the *Fondo de Investigación Sanitaria* (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). SB was supported by *Fundación Conchita Rábago*. DC was supported by a contract from *Comunidad de Madrid* (PEJD-2016/BMD-2682, *Sistema de Garantía Juvenil*), and LC-J was supported by a contract from MINECO (PEJ-2014-A-31609, *Sistema de Garantía Juvenil*), both cofinanced by *Fondo Social Europeo* (FSE) and *Iniciativa de Empleo Juvenil* (IEJ). We are also grateful to Oliver Shaw for revising the manuscript for English usage and style and to I. Mahillo for his statistical support.

- dermatitis—PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 137:1347–58. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.010
21. Baos S, Calzada D, Cremades L, Sastre J, Quirarte J, Florido F, et al. Data set on a study of gene expression in peripheral samples to identify biomarkers of severity of allergic and nonallergic asthma. *Data Brief* (2016) 10:505–10. doi:10.1016/j.dib.2016.12.035
 22. Baos S, Calzada D, Cremades L, Sastre J, Quirarte J, Florido F, et al. Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma. *Mol Immunol* (2017) 82:34–45. doi:10.1016/j.molimm.2016.12.012
 23. GEMA (Guía española del manejo del asma). *Arch Bronconeumol* (2009) 45:2–35. doi:10.1016/S0300-2896(09)73459-3
 24. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, et al. Periostin a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130:647–54. doi:10.1016/j.jaci.2012.06.025
 25. Parulekar AD, Atik MA, Hanania NA. Periostin, a novel biomarker of Th2-driven asthma. *Curr Opin Pulm Med* (2014) 20:60–5. doi:10.1097/MCP.0000000000000005
 26. Gao J, Garulacan LA, Storm SM, Opitck GJ, Dubaqui Y, Hefta SA, et al. Biomarker discovery in biological fluids. *Methods* (2005) 35:291–302. doi:10.1016/j.ymeth.2004.08.020
 27. Tsai YS, Tseng YT, Chen PS, Lin MC, Wu CC, Huang MS, et al. Protective effects of elafin against adult asthma. *Allergy Asthma Proc* (2016) 37:15–24. doi:10.2500/aap.2016.37.3932
 28. Verrier T, Solhonne B, Sallenave JM, García-Verdugo I. The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int J Biochem Cell Biol* (2012) 44:1377–80. doi:10.1016/j.biocel.2012.05.007
 29. Lee CG, Da Silva CA, De la Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* (2011) 73:479–501. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142250
 30. Prakash M, Bodas M, Prakash D, Nawani N, Khetmalas M, Mandal A, et al. Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in 'outside-in' signaling. *Cell Signal* (2013) 25:1567–73. doi:10.1016/j.cellsig.2013.03.016
 31. Hinks TS, Brown T, Lau LC, Rupani H, Barber C, Elliott S, et al. Multidimensional endotyping in patients with severe asthma reveals inflammatory heterogeneity in matrix metalloproteinases and chitinase 3-like protein 1. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 138:61–75. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.020
 32. Allen TC, Kurdowska A. Interleukin 8 and acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* (2014) 138:266–9. doi:10.5858/arpa.2013-0182-RA
 33. Mingomataj EC, Bakiri AH. Regulator versus effector paradigm: interleukin-10 as indicator of the switching response. *Clin Rev Allergy Immunol* (2016) 50:97–113. doi:10.1007/s12016-015-8514-7
 34. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun* (2014) 15:511–20. doi:10.1038/gene.2014.45
 35. Tomokiyo R, Jinnouchi K, Honda M, Wada Y, Hanada N, Hiraoka T, et al. Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors. *Atherosclerosis* (2002) 161:123–32. doi:10.1016/S0021-9150(01)00624-4
 36. Kelley JL, Ozment TR, Li C, Schweitzer JB, Williams DL. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit Rev Immunol* (2014) 34:241–61. doi:10.1615/CritRevImmunol.2014010267
 37. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:116–26. doi:10.1038/nri727
 38. Trivedi NN, Caughey GH. Mast cell peptidase: chameleons of innate immunity and host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2010) 42:257–67. doi:10.1165/rcmb.2009-0324RT
 39. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Fibbens NL, Powell H, et al. Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 133:997–1007. doi:10.1016/j.jaci.2013.12.1091
 40. Zhao P, Lu Y, Liu L. Correlation of decreased expression of PHLDA1 protein with malignant phenotype of gastric adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* (2015) 8:5230–5.
 41. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* (2009) 180:388–95. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC
 42. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:15858–63. doi:10.1073/pnas.0707413104
 43. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* (2011) 365:1088–98. doi:10.1056/NEJMoa1106469
 44. Swartz JM, Byström J, Dyer KD, Nitto T, Wynn TA, Rosenberg HF. Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes. *J Leukoc Biol* (2004) 76:812–9. doi:10.1189/jlb.0304182
 45. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* (2004) 22:789–815. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104716
 46. Hosoki K, Ying S, Corrigan C, Qi H, Kurosky A, Jennings K, et al. Analysis of a panel of 48 cytokines in BAL fluids specifically identifies IL-8 levels as the only cytokine that distinguishes controlled asthma from uncontrolled asthma, and correlates inversely with FEV₁. *PLoS One* (2015) 10(5):e0126035. doi:10.1371/journal.pone.0126035
 47. Thomson NC. Novel approaches to the management of noneosinophilic asthma. *Ther Adv Respir Dis* (2016) 10:211–34. doi:10.1177/1753465816632638
 48. Watz H, Uddin M, Pedersen F, Kirsten A, Goldmann T, Stellmacher F, et al. Effects of the CXCR2 antagonist AZD5069 on lung neutrophil recruitment in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* (2017) 45:121–3. doi:10.1016/j.pupt.2017.05.012
 49. O'Byrne PM, Metev H, Puu M, Richter K, Keen C, Uddin M, et al. Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* (2016) 4:797–806. doi:10.1016/S2213-2600(16)30227-2
 50. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* (2007) 357:2016–27. doi:10.1056/NEJMoa073600
 51. Hansen JW, Thomsen SF, Porsbjerg C, Rasmussen LM, Harmsen L, Johansen JS, et al. YKL-40 and genetic status of CHI3L1 in a large group of asthmatics. *Eur Clin Res J* (2015) 2:25117. doi:10.3402/ecrj.v2.25117

Conflict of Interest Statement: The authors declare that they have no conflicts of interest. The data published in this report are being evaluated for protection (Request Number: P201730947).

Copyright © 2018 Baos, Calzada, Cremades-Jimeno, Sastre, Picado, Quirarte, Florido, Lahoz and Cárda. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.